

## DESCRIPTION

## METHODS OF SCREENING FOR AGONISTIC ANTIBODIES

5 Technical Field

The present invention relates to novel methods of screening for agonistic antibodies.

Background Art

- 10 Antibodies in the blood are highly stable, and since they have no antigenicity, they are drawing much attention as pharmaceuticals. Of these, it has been a while since bispecific antibodies, which can simultaneously recognize two types of antigens, have been proposed, but only those that merely bind two types of antigens exist at present.
- 15 However, since antibodies bind to specific epitopes within antigens, it may be possible to place two antigens at desirable distances and angles by selecting appropriate antibody combinations.

- In many cytokine receptors, it is thought that the angle and length of chains that form homo/hetero-dimers change when a ligand binds, thus enabling the receptors to transmit signals into cells.
- 20 Thus, appropriate anti-receptor antibodies can mimic receptor dimerization initiated by ligand-binding, and become potential agonistic antibodies. Monoclonal antibodies that display agonistic function against MPL, a homodimer, have already been reported (Blood
- 25 1998 Sep 15; 92(6): 1981-8, US98/17364). However, to obtain such agonistic antibodies, selection must be made from a huge range of antibodies, requiring effective selection methods.

- In conventional assays, it is necessary to select antibodies that bind to antigens, i.e., receptor chains, and add these antibodies
- 30 to an appropriate cell assay system that responds to the ligands. This becomes particularly troublesome where the receptors form heterodimers. Antibodies against each of the two chains (A, B) that form the receptor must be selected, and every combination of A and B must be tested one by one. In addition, to generate bivalent
- 35 antibodies, it is necessary to fuse antibody-producing hybridomas, or to construct expression vectors for all of the antibodies, and

introduce all combinations thereof into cells. Examination of 100 types of antibodies against each of the A and B chains necessitates the testing of 10,000 types of combinations, and requires a total of 400 types of expression vectors for L and H chains to be constructed and introduced into cells 10,000 times. There are also methods that use libraries that provide antibodies displayed on phages as bispecific diabodies. However, since the direct addition of *E. coli* culture supernatant to cell culture systems has an impact on cells, purification becomes necessary and monospecific diabody contamination (theoretically 50%) becomes inevitable.

#### Disclosure of the Invention

The present invention was achieved in view of the above. An objective of the present invention is to provide efficient novel methods of screening for agonistic antibodies, especially multi-specific agonistic antibodies. More specifically, it aims to provide methods of screening for agonistic antibodies that utilize autocrine cell growth.

With the above objective, the present inventors conducted extensive experiments. As a result, they discovered effective methods of screening for agonistic antibodies, such as the methods below. In these methods, cell strains that proliferate in a ligand-dependent manner are infected with anti-receptor antibody libraries. Antibody genes are recovered from strains that replicate autonomously upon autocrine stimulation due to the binding of agonistic antibodies, and agonistic antibodies are prepared based on the recovered genes. When the antibodies are multi-specific agonistic antibodies, cell strains with ligand-dependent growth are super-infected with antibody libraries against each of the various receptor chains. Antibody genes are recovered from strains that replicate autonomously upon autocrine stimulation due to the binding of the multi-specific agonistic antibodies in appropriate combinations, and multi-specific agonistic antibodies are generated based on the recovered genes. More specifically, this can be carried out, for example, as follows:

Mice are first immunized with either A-chain or B-chain

receptors, and mRNAs are extracted from the splenocytes of these animals. L-chain and H-chain variable regions are recovered by RT-PCR using primers that correspond to mouse CDRs. Single chain variable regions (scFvs) are synthesized by assembly PCR to construct a phase library. Antigen-binding antibody clones are concentrated by panning, the synthesized single chain variable regions are inserted between a signal sequence for animal cells and CH1-hinge-CH2-CH3 and, to construct a library that is integrated into plasmids to be used for producing retroviruses. By expressing chimeric chains comprised of a target receptor chain and the G-CSFR intracellular domain, Ba/F3 cells, whose proliferation depends on the binding of the ligand to target chimera receptor, are prepared. These cells are infected with anti-A-chain antibody library viruses. These cells are further infected with anti-B-chain antibody library viruses, and cultured following the washing and removal of factors. Cells that now reproduce factor-dependently are recovered and cloned, and activity is confirmed by using the culture supernatants and physiological assay systems. The antibody CDR genes incorporated in the chromosomes of the clones are recovered using PCR, and applied to the production of multi-specific agonistic antibodies. In this method, effective screening can be carried out using antibodies as libraries. Furthermore, the manipulations are simple, and there is no need for complicated operations.

As described above, the present inventors developed novel methods that can effectively screen for agonistic antibodies, thus completing the present invention.

In other words, the present invention relates to novel methods that can effectively screen for multi-specific agonistic antibodies. More specifically, the present invention provides:

[1] a method of screening for agonistic antibodies that comprises the following steps (a) to (c):

(a) providing a cell that expresses a multimer-forming receptor and a test antibody, where the cell grow depending on a factor of the receptor;

(b) determining the test antibody to comprise agonistic function when autocrine cell growth is autonomous; and

(c) selecting those antibodies that comprise agonistic function;  
[2] the method of [1] that further comprises the step of introducing a gene that encodes the heavy chain of the test antibody into the cell of step (a) having been introduced with a gene that encodes the light chain of the test antibody and a gene that encodes the receptor;  
[3] the method of [1] or [2] where the receptor is a chimeric receptor with a protein that comprises a function of transducing a cell growth signal;

[4] the method of any one of [1] to [3] where the receptor is a dimer-forming receptor;

[5] the method of [4] where the dimer-forming receptor is a homo-dimer;

[6] the method of [4] where the dimer-forming receptor is a hetero-dimer;

[7] the method of any one of [1] to [6] where the protein that comprises the function of transducing a cell growth signal is a G-CSF receptor;

[8] the method of any one of [1] to [7] that comprises the introduction of an antibody library to the cell;

[9] the method of [8] where the antibody library is a retroviral antibody library;

[10] the method of any one of [1] to [9] where the test antibody is a multi-specific antibody;

[11] the method of [10] that comprises linking the test antibody's heavy and light chain variable regions with a linker;

[12] the method of [11] that comprises producing the antibody with variable regions linked by a linker, using a method that comprises the steps (a) to (c):

(a) producing a single chain Fv against the first receptor chain;

(b) producing a single chain antibody against the first receptor chain by linking the single chain Fv with a CH1-hinge-CH2-CH3; and

(c) producing a multi-specific antibody that comprises the single chain antibody produced in step (b);

[13] the method of [11] that comprises producing the antibody with its variable regions linked by a linker, using a method that comprises the steps (a) to (c):

- (a) producing a single chain Fab against the first receptor chain;
- (b) producing a single chain antibody against the first receptor chain by linking the single chain Fab with an Fc; and
- (c) producing a multi-specific antibody that comprises the single chain antibody produced in step (b);

5 [14] a method of screening for an agonist multi-specific antibody that comprises the steps (a) to (c):

- (a) contacting between a multi-specific antibody and a receptor comprising a first receptor chain and a second receptor chain, where the multi-specific antibody comprises a variable region that can bind with the first receptor chain and a variable region that can bind with the second receptor chain;

- (b) determining whether the test multi-specific antibody comprises agonistic function; and

- (c) selecting antibodies that comprise agonistic function;

10 [15] the method of [14] that comprises expressing the receptor and the test multi-specific antibody in the same cell;

[16] the method of [15] where the cell is a cell that grows depending on a receptor factor;

20 [17] the method of [15] or [16] where the receptor comprises the function of transducing a cell growth signal;

[18] the method of [17] where the receptor is a chimeric receptor with a protein that comprises the function of transducing a cell growth signal;

25 [19] the method of [18] where the protein that comprises the function of transducing a cell growth signal is a G-CSF receptor;

[20] the method of any one of [15] to [19] where the test multi-specific antibody is determined to comprise agonistic function when autocrine cell growth is autonomous;

30 [21] the method of any one of [15] to [20] that further comprises the step of introducing an antibody library against the first receptor chain and the second receptor chain into the cell, respectively;

[22] the method of [21] where the antibody library is a retroviral antibody library;

35 [23] the method of any one of [14] to [22] that comprises linking the light chain variable regions and heavy chain variable regions

of the multi-specific antibody with a linker;

[24] the method of [23] that comprises producing a multi-specific antibody with variable regions linked by a linker, using a method that comprises steps (a) to (c):

- 5 (a) producing a single chain Fv against the first receptor chain;
- (b) producing a single chain antibody against the first receptor chain by linking the single chain Fv with a CH1-hinge-CH2-CH3; and
- (c) producing a multi-specific antibody that comprises the single chain antibody produced in step (b);

- 10 [25] the method of [23] that comprises producing the multi-specific antibody with variable regions linked by a linker, using a method that comprises steps (a) to (c):

- (a) producing a single chain Fab against the first receptor chain;
- (b) producing a single chain antibody against the first receptor
- 15 chain by linking the single chain Fab with an Fc; and
- (c) producing a multi-specific antibody that comprises the single chain antibody produced in step (b);

- [26] the method of any one of [14] to [25] that comprises the introduction of "Knobs-into-holes" by amino acid substitution at the
- 20 multi-specific antibody CH3;

[27] the method of any one of [14] to [26] where the multimer is a heterodimer;

[28] the method of any one of [14] to [27] where the multi-specific antibody is a bispecific antibody;

- 25 [29] a method for producing an agonistic antibody comprising steps (a) to (c):

- (a) screening for an agonistic antibody by a method of any one of [1] to [28];
- (b) introducing a gene that encodes the agonistic antibody selected
- 30 by the screening of step (a) into a host cell;
- (c) recovering the agonistic antibody from the host cell of step (b) or its cell culture supernatant;

- [30] a cell that expresses an antibody, and a receptor that multimerizes by binding with the antibody, where the cell grow
- 35 depending on a factor of the receptor;

[31] the cell of [30] where the receptor is a chimeric receptor with

a protein that comprises the function of transducing a cell growth signal;

[32] the cell of [30] or [31] where the antibody is a multi-specific antibody;

5 [33] the cell of any one of [30] to [32] where the receptor that is multimerized by binding with the antibody comprises the function of transducing a cell growth signal;

[34] a multi-specific agonistic antibody that comprises the linking of the light chain variable region and heavy chain variable region  
10 by linkers, and the introduction of "Knobs-into-holes" by amino acid substitution at the antibody CH3.

In the present invention, set terms have been defined to simplify understanding of the terms used within the present  
15 specification. It should be understood that these definitions should not be used to limit the present invention.

The present invention provides effective novel methods of screening for agonistic antibodies. In these methods, test antibodies comprising variable regions that can bind receptors are  
20 contacted with those receptors (step (a)).

In the present invention, when the antibodies are multi-specific antibodies, multi-specific test antibodies comprising variable regions that can bind the first and second receptor chains are contacted with those receptors (step (a)).

25 "Agonistic antibody" refers to an antibody that comprises an agonistic function against a given receptor. In general, when an agonist ligand (factor) binds to a receptor, the tertiary structure of the receptor protein changes, and the receptor is activated (when the receptor is a membrane protein, a cell growth signal or such is usually transduced). If the receptor is a dimer-forming type, an  
30 agonistic antibody can dimerize the receptor at an appropriate distance and angle, thus acting similarly to a ligand. An appropriate anti-receptor antibody can mimic dimerization of receptors performed by ligands, and thus can become an agonistic  
35 antibody.

"Multi-specific antibodies" refer to antibodies that can bind

specifically with a number of types of antigens. That is, multi-specific antibodies are antibodies that comprise specificities to at least two different types of antigens. Usually, such molecules bind with two antigens (i.e., a bispecific antibody). However, in the present specification, "multi-specific antibody" also comprises antibodies that comprise specificities against more antigens (for example, three types). A multi-specific antibody can be a full-length antibody or a fragment thereof (for example,  $F(ab')_2$  bispecific antibody). Multi-specific antibodies are useful in clinical fields such as immunodiagnosics, therapy, and diagnoses using immunological assays. Suitable examples of the multi-specific antibodies of the present invention include bispecific antibodies that can specifically bind to two types of antigens. Usually, when the antigens are hetero-receptors, bispecific antibodies will recognize each of the two polypeptide chains that make up the hetero-receptor.

In the present invention, "multi-specific agonistic antibodies" refer to antibodies that comprise a quality (characteristic) of both the above-mentioned agonistic antibodies and multi-specific antibodies.

In a preferable embodiment of the present invention, the test antibodies for use in the screening methods of the present invention are first prepared. However, the process for preparing the test antibodies is not essential. The test antibodies can be known compounds, or antibody molecules (or antibody-like molecules) that exist in nature, or fragments thereof, and such.

In the present invention, there are no limitations as to what kinds of antibodies can be used as test antibodies, but multi-specific antibodies are preferable, and bispecific antibodies are even more preferable.

Equally, there are no particular limitations as to what kinds of receptors can be used as the receptors to which the agonistic antibodies of the present invention bind and transmit signals. Preferable examples of the receptors include cell membrane receptors, more preferably receptors that form multimers, and even more preferably receptors that form dimers (e.g., heteroreceptors).



The above-mentioned test antibodies of the present invention can usually be prepared by immunizing animals with antigens. The antigens used to immunize the animals include complete antigens that have immunogenicity, and incomplete antigens (including haptens) having no antigenicity. In the present invention, receptors for which agonistic antibodies to be screened are thought to act as ligands are used as antigens (immunogens) mentioned above. There are no specific limitations as to the above receptors, but usually they are multimers, and preferably dimers. Dimers include homodimers, which are made of identical receptor chains, and heterodimers, which are made of different receptor chains. Heterodimers are more preferable. Examples of the immunized animals that can be used include mice, hamsters, rhesus monkeys, and such. Immunization of these animals with the antigens can be carried out by methods known to those skilled in the art. In the present invention, the antibody L-chain and H-chain variable regions are preferably recovered from the immunized animals or cells of those animals. This process can be carried out using techniques generally known to those skilled in the art. The animals immunized by the antigens express antibodies against those antigens, particularly in splenocytes. Thus, for example, mRNA can be prepared from the splenocytes of immunized animals, and using primers that correspond to the CDR of those animals, the L-chain and H-chain variable regions can be recovered by RT-PCR. Here, "CDR" refers to three regions (CDR1, CDR2 and CDR3) that directly and complementarily bind the antigen, and are present in the hyper-variable region of antibody variable regions. Examples of primers that can be used as primers that correspond to the CDR include primers that correspond to a framework with less variation than the CDR, or primers that correspond to the signal sequences, and CH1 and CL. In addition, lymphocytes can also be immunized *in vitro*. After this, DNAs that encode the antibodies contained in the spleens of immunized animals, or in lymphocytes, can be isolated by conventional methods, for example, methods using nucleotide probes and such that can bind specifically to the genes encoding antibody heavy and light chains.

The receptors that act as immunogens can be the entire proteins that make up those receptors, or peptide fragments of those proteins.

In a preferable embodiment of the present invention, if the receptor is a heteroreceptor, two or more different types of peptide chain fragments are used as immunogens for the peptide chain fragment making up one part of the heteroreceptor. In the present invention, the different peptide chain fragments are called the "first receptor chain" and the "second receptor chain" respectively. Where a receptor of the present invention forms a dimer, the above-mentioned "first receptor chain" and "second receptor chain" are preferably peptide chains (or fragment peptide thereof) that respectively make up each subunit of that dimer. For example, when a heterodimer is made up of two types of peptide chains, the A-chain and the B-chain, it is preferable that the A-chain (or a peptide fragment thereof) be the "first receptor chain", and the B-chain (or a peptide fragment thereof) be the "second receptor chain". By immunizing animals using these first and second receptor chains as immunogens, test antibodies can be prepared that comprise variable regions which can bind those first and second receptor chains.

Depending on the situation, the immunogens used to immunize the animals can also be soluble antigens that bind with other molecules, or fragments thereof. When using receptor-like transmembrane molecules as the antigens, it is preferable to use their fragments (for example, the extracellular region of a receptor). The immunogens can also be cells that express transmembrane molecules on the cell surface. Such cells can be naturally derived (tumor cell lines, etc.) or may be those constructed to express a transmembrane molecule using recombinant technologies.

In a preferable embodiment of the above screening methods of the present invention, cells whose growth depends on ligands (factors) of the receptors for which the agonistic antibodies act as agonists, are first infected with a viral antibody library against each of the receptors. Cells infected with that library produce anti-receptor antibodies. In the present invention, the antibodies produced by the above-mentioned cells are supplied as "test antibodies" for the screening methods of the present invention. When the antibodies are multi-specific antibodies, the cells whose growth depends on ligands (factors) of the receptors for which the agonistic antibodies act as

agonists, are super-infected with viral antibody libraries against each of the different types of receptor chains. Cells infected with these libraries produce a variety of anti-receptor antibodies that arise from appropriate peptide chain combinations.

5       The above-mentioned cells of the present invention are usually eukaryote-derived cells, preferably animal cells, and more preferably human-derived cells. In a preferable embodiment of the present invention, cells expressing test antibodies also express the above receptors (the receptors for which agonistic antibodies act as  
10 agonists). Thus, a preferable embodiment of the present invention comprises expressing a receptor and a test antibody in the same cell. If a test antibody secreted from a cell binds with that receptor and comprises agonistic function against a receptor, the receptor would transduce a cell growth signal and consequently, the cell would  
15 undergo autonomous autocrine replication. "Autonomous autocrine replication" refers to the phenomenon whereby cells replicate independently using a substance produced by the cell itself as a growth signal. Multi-specific agonistic antibodies can be screened using the presence or absence of autonomous autocrine replication as an  
20 index. In a preferable embodiment of the present invention, when cells expressing a test antibody and receptor undergo autonomous autocrine replication, the test antibody can be determined to comprise agonistic function.

Agonistic function of the test antibodies of the present  
25 invention can be determined using the indexes below:

(1) Whether or not a factor-dependently growing cell will grow in the same way when a test antibody is added during cell culture as when a factor is added. If the cell grows, the test antibody is determined to comprise agonistic function.

30 (2) Whether or not a cell line with intrinsic factor-dependent activities (not limited to growth) shows the same reaction when a test antibody is added during cell culture as when a factor is added. If the cell line shows the same reaction as for a factor, the test antibody is determined to comprise agonistic  
35 function.

In the present invention, cells transducing the above-mentioned

cell growth signals usually express the receptors for which the antibodies selected by the screening methods of the present invention act as agonists on the cell surface. These cells transduce cell growth signals by binding with the ligands of those receptors (for example, agonistic antibodies). Thus, in the present invention, cells that are used are preferably cells that can proliferate receptor ligand (factor)-dependently (cells with factor-dependent proliferation). Preferably, on binding with a ligand, the receptors of the present invention usually transduce cell growth signals. However, when the receptors of the present invention are of a type that do not transduce cell growth signals, they can be used in the present invention as so-called "chimeric receptors", by fusing with receptors of a type that do transduce cell growth signals. More specifically, a chimeric receptor that comprises an extracellular region of a ligand-binding receptor, and an intracellular region of a type of receptor that transduces cell growth signals can be used. These chimeric receptors transduce cell growth signals on binding with a ligand. Receptors suitable for constructing chimeric receptors by fusion with ligand-binding receptors are not especially limited as long as they are of a type that transduces cell growth signals. Receptors that can be used include cytokine receptors and receptors known to those skilled in the art. G-CSF receptor, mpl, neu, GM-CSF receptor, EPO receptor, c-Kit, FLT-3 and such are specific examples of such receptors. A suitable example of the above cells that grow factor-dependently is a BaF3 factor-dependent cell that expresses a chimeric receptor whose extracellular portion is a ligand receptor chain, and whose intracellular portion is a G-CSF receptor chain. Other examples of cells that can be used in the present invention include NFS60, FDCP-1, FDCP-2, CTLL-2, DA-1, KT-3, and such.

As described above, the present invention comprises antibodies, and cells that express receptors which multimerize on binding with those antibodies. The present invention also comprises cells whose growth is dependent on those receptor factors.

In the present invention, "antibodies" comprise so-called "immunoglobulins", as well as natural antibodies, antibody-like molecules, and antibody fragments. Natural antibodies

and immunoglobulins are generally heterotetramers of about 150,000 Daltons consisting of two identical light chains (L chains) and two identical heavy chains (H chains). Each of the light chains is connected to a heavy chain through a single covalent disulfide bond.

5 However, the number of disulfide bonds between the heavy chains varies depending on the isotype of the immunoglobulin. Both of the heavy and light chains further have intramolecular disulfide bridges at constant distances. Each of the heavy chains has a variable region ( $V_H$ ) at one end and many constant regions connected thereto. Each

10 of the light chains has a variable region ( $V_L$ ) at one end and a constant region at the other end. The constant region and the variable region of the light chains are placed side-by-side to the first constant region and the variable region of the heavy chain, respectively. Specific amino acid residues are considered to form the interface

15 of the variable region of the light and heavy chains (Chothia C. et al., J. Mol. Biol. 186:651-663, 1985; Novotny J., Haber E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4592-4596, 1985). In the present invention, a preferable example used as a test antibody is an immunoglobulin G (IgG).

20 The above-mentioned phrase "antibody fragment" refers to a part of a full-length antibody and generally indicates an antigen-binding region or a variable region. For example, antibody fragments include Fab, Fab',  $F(ab')_2$  and Fv fragments. Papain digestion of an antibody produces two identical antigen-binding

25 fragments called Fab fragments each having an antigen-binding region, and a remaining fragment called "Fc" due to ready crystallization. On the other hand, pepsin digestion results in a  $F(ab')_2$  fragment (which has two antigen-binding sites and can cross bind antigens) and another remaining fragment (called pFc'). Other fragments

30 include diabody (diabodies), linear antibodies, single-chain antibodies, and multispecific antibodies formed from antibody fragments. In this specification, "antibody fragment" of an antibody indicates Fv, F(ab) and  $F(ab')_2$  fragments, and such.

Herein, an "Fv" fragment is the smallest antibody fragment

35 and contains a complete antigen recognition site and a binding site. This region is a dimer ( $V_H$ - $V_L$  dimer) wherein the variable regions of

each of the heavy chain and light chain are strongly connected by a noncovalent bond. The three CDRs of each of the variable regions interact with each other to form an antigen-binding site on the surface of the  $V_H$ - $V_L$  dimer. Six CDRs confer the antigen-binding site of an antibody. However, a variable region (or a half of Fv which contains only three CDRs specific to an antigen) alone has also the ability to recognize and bind an antigen although its affinity is lower than the affinity of the entire binding site.

Moreover, a Fab fragment (also referred to as F(ab)) further includes the constant region of the light chain and a constant region ( $C_{H1}$ ) of the heavy chain. An Fab' fragment differs from the Fab fragment in that it additionally has several residues derived from the carboxyl end of the heavy chain  $C_{H1}$  region which contains one or more cysteines from the hinge domain of the antibody. Fab'-SH indicates an Fab' wherein one or more cysteine residues of the constant region has a free thiol-group. The F(ab') fragment is produced by the cleavage of disulfide bonds between the cysteines in the hinge region of the F(ab')<sub>2</sub> pepsin digest. Other chemically bound antibody fragments are also known to those skilled in art.

In the present invention, diabodies (Db) mean bivalent antibody fragments constructed by gene fusion (Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); EP 404,097; WO93/11161). Diabodies are dimers comprising two polypeptide chains, where each polypeptide chain comprises a light chain variable domain ( $V_L$ ) and a heavy chain variable domain ( $V_H$ ) connected with a linker short enough to prevent interaction of these two domains, for example a linker of about five amino acids. The  $V_L$  and  $V_H$  domains encoded on the same polypeptide chain will form a dimer because the linker between the  $V_L$  and  $V_H$  is too short to form a single chain variable region fragment. Thus, the result is a diabody that comprises two antigen-binding sites. If the  $V_L$  and  $V_H$  domains directed against two different antigens (a and b) are expressed simultaneously as combinations of  $V_{La}$ - $V_{Hb}$  and  $V_{Lb}$ - $V_{Ha}$  connected with a linker of about five residues, they can be secreted as a bispecific diabody.

A single-chain antibody (hereafter also described to as sc Fv) or sFv antibody fragment contains the  $V_H$  and  $V_L$  regions of an

antibody, and these regions exist on a single polypeptide chain. Generally, an Fv polypeptide further contains a polypeptide linker between the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> regions, and therefore an scFv can form a structure necessary for antigen binding. See, Pluckthun "The Pharmacology of

15 Monoclonal Antibodies" Vol. 113 (Rosenburg and Moore eds. (Springer Verlag, New York) pp. 269-315, 1994) for a review on scFv. In the present invention, linkers are not especially limited as long as they do not inhibit expression of antibody variable regions linked at their ends.

10 In addition, a technology using gene engineering to create "humanized antibodies" is known. In this technology, all but the CDR of monoclonal antibodies from non-human mammals (such as mice, rats, and hamsters) is replaced with frame structure sequences of variable domains from human immunoglobulins (see for example, Jones et al.,

15 Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)). Humanized antibodies may comprise amino acids that are comprised in neither the CDR introduced into the recipient antibody nor the frame structure sequences. Normally, such introduction of amino acid

20 residues is performed to optimize antibodies for more precise antigen recognition and binding. The variable domains in the test antibodies of the present invention also comprise altered variable domains, such as humanized domains.

In the present invention, suitable examples of the test

25 antibodies that are expressed in cells by antibody libraries include IgG, antibody molecules where scFv is attached at the N-terminal of CH1-hinge-CH2-CH3, scIgG (antibody molecules where scFab is attached at the N-terminal of hinge-CH2-CH3), scDb, and such. In the present invention, usually antibody libraries against each of the different

30 antigens are super infected into cells; however, when using scDb, a single library can be used as the antibody library.

In a preferable embodiment of the present invention, antibody libraries are introduced into cells. When the antibodies are multi-specific antibodies, antibody libraries against each of the

35 first receptor chain and the second receptor chain are introduced into cells. Retrovirus antibody libraries, for example, can be

suitably used as these antibody libraries. Retroviruses comprise the following features: retroviral infection efficiency can be controlled to about 10%, so most of the infected cells can be expected to incorporate one copy of the virus. In addition, introduced genes can be incorporated into host chromosomes, so stable expression of these genes over a long period can also be expected. Other viral vectors that can be produced by antibody libraries include RNA viruses and DNA viruses such as adenoviruses, adeno-associated viruses, herpes viruses, vaccinia viruses, pox viruses, sindbis viruses, sendai viruses, SV40 and HIV .

The antibody libraries can be constructed by known methods (see for example, McCafferty et al., Nature 348: 55-554 (1990); Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 582-597 (1991), etc). More specifically, antibody libraries can be constructed as follows, but the construction methods are not limited to these. First, mice are immunized with either A-chain or B-chain receptors, and mRNAs are extracted from the splenocytes of these animals. The L-chain and H-chain variable regions are then recovered by RT-PCR using primers that correspond to mice CDRs. Single chain variable regions (scFv) are synthesized using assembly PCR to construct antibody libraries. Antigen-binding antibody clones are concentrated by panning, these single chain variable regions are inserted between a signal sequence for animal cells and CH1-hinge-CH2-CH3 , and plasmids into which libraries are incorporated for generating retroviruses are constructed. Alternatively, scFab is synthesized, and libraries inserted between a signal sequence and hinge-CH2-CH3 are constructed. scDb libraries can also be made.

The antibody libraries of the present invention can also be constructed using plasmid expression vectors. Examples of expression vectors when the above cells are animal cells include pME18S (Med. Immunol. 20: 27-32 (1990)), pEF-BOS (Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990)), pCDM8 (Nature 329: 840-842 (1987)), pRSVneo, pSV2-neo, pCDNA1/Amp (Invitrogen), pCDNA1, pAmoERC3Sc, pCDM8 (Nature 329: 840 (1987)), pAGE107 (Cytotechnology 3: 133 (1990)), pREP4 (Invitrogen), pAGE103 (J. Biochem. 101: 1307 (1987)), pAmoA, pAS3-3,



pCAGGS (Gene 108: 193-200 (1991)), pBK-CMV, pcDNA3.1 (Invitrogen), and pZeoSV (Stratagene). Expression promoters may be cytomegalovirus IE gene promoter and enhancer, SV40 early promoter, a retrovirus LTR such as that from RSV, HIV, and MMLV, and a gene promoter from animal cells such as metallothionein,  $\beta$ -actin, elongation factor-1, HSP genes, and such. Alternatively, viral vectors may be used as above. Viral vectors may be DNA viruses and RNA viruses such as retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, herpes viruses, vaccinia viruses, poxviruses, Simbu viruses, Sendai viruses, SV40, and HIV.

The methods for introducing plasmid expression vectors may vary depending on the type of cell and vector. Any method can be used as long as expression vector DNA can be introduced into cells. For example, the methods include electroporation (Cytotechnology 3: 133 (1990)), calcium phosphate (JP-A Hei 2-227075), lipofection (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987); Virology 52: 456 (1973)), co-precipitation with calcium phosphate, DEAE-dextran, direct injection of DNA using microcapillaries, and such.

Furthermore, where the receptors are heteroreceptors (where the antibodies are multi-specific antibodies), expression of the test antibodies of the present invention is usually possible by introducing, into one cell, expression libraries (vectors) for each of the two types of light chains and two types of heavy chains. No compatibility is usually present for the light and heavy chain combinations. For four chains, there are ten types of combinations. The agonistic antibodies finally screened by the methods of the present invention are preferably whole antibodies that are stable in the blood. Thus, it is preferable that the test antibodies used in the screening methods of the present invention are also full length. When, as above, libraries are expressed in cells as is, ten different types of antibodies are secreted. Due to the potential of neutralizing effects by other antibody combinations, it is preferable to express test antibodies that comprise the desired combination of heavy and light chains. To get the desired combination, for example, a common light chain is preferably used. Alternatively, to avoid homogenous combinations of heavy chains, it is also possible to encourage

heterogeneous combination using amino acid substitution to introduce "knobs-into-holes" (Protein Engineering Vol. 9, 617-621, 1996; WO98/50431) at heavy chain CH3 regions, thus blocking the formation of heavy chain homodimers. Thus in the present invention, test antibody CH3s are preferably characterized by the introduction of "knobs-into-holes" by amino acid substitution. Appropriate amino acid substitutions are carried out in the CL and CH1, and by defining the combinations of light and heavy chains, the production efficiency of hetero-antibodies can be raised. Furthermore, combinations of light and heavy chains can be defined using scFv single-chain variable regions that link the light and heavy chain variable regions with linkers. Test antibodies can also be expressed in the form of scFv-CH1-hinge-CH2-CH3. Therefore, in one embodiment of the present invention, the test antibodies are characterized by the linking of their light and heavy chain variable regions by linkers. These multi-specific test antibodies with variable regions linked by linkers can be produced, for example, as below. However, production is not particularly limited to these methods.

- (1) A single chain Fv against the first receptor chain is produced. Next, by linking that single chain Fv with CH1-hinge-CH2-CH3, a single chain antibody against the first receptor chain is produced. Test antibodies comprising that single chain antibody are then produced.
- (2) A single chain Fab against the first receptor chain is produced. Next, by linking that single chain Fab with Fc, a single chain antibody against the first receptor chain is produced. Test antibodies comprising that single chain antibody are then produced.

In addition, the present invention's screening methods for multi-specific agonistic antibodies can be provided by using multi-specific antibodies, produced by known manufacturing methods, as test antibodies.

The "contact" of test antibodies and receptors in the above step (a) in the present invention can refer to, for example, the "contact" of receptors expressed in the cells with test antibodies expressed

in and secreted out of the cells as mentioned above. However, "contact" is not particularly limited to this form of contact.

In the above-mentioned screening methods of the present invention, whether or not a test antibody comprises agonistic function is then determined (step b), and antibodies comprising agonistic function are selected (step c).

In the above-mentioned steps in a preferable embodiment of the present invention, whether or not test antibodies comprise agonistic function is judged by using the presence or absence of the above-mentioned autonomous autocrine cell replication as an index. Where there is autonomous autocrine cell replication, antibodies expressed by those cells are selected as agonistic antibodies.

Agonistic antibodies selected in the screening methods of the present invention are usually recovered from cells with autonomous autocrine replication, and cloned accordingly. These cells are used to recover the CDR genes of the above-mentioned multi-specific agonistic antibodies by PCR, and these recovered genes can then be used for antibody production. One skilled in the art can use routine procedures to ordinarily carry out the production of antibodies based on the CDR genes.

Where the receptor is a heteroreceptor, the screening methods for multi-specific antibodies of the present invention can be carried out specifically as below. However, this method is one embodiment of the present invention, and the methods of the present invention are not especially limited to this method.

Antibody phage libraries are produced from animals immunized with the extracellular region of receptor chains that use antibodies as ligands (e.g. the A chain and B chain). Anti-receptor chain antibodies are selected by panning, and then transformed to retroviral vector libraries.

Next, a cell line that proliferates ligand-dependently is prepared. An anti-A-chain antibody library is introduced into these cells by infection, and infected cells are selected by agent resistance, which was incorporated in the vector. Selected cells are then cultured and subsequently, super-infected with the anti-B-chain antibody library. In this way, a library of cells expressing

bispecific antibodies of every anti-A-chain antibody and anti-B-chain antibody combination can be constructed. Of these, only clones that secrete appropriately combined bispecific antibodies showing agonistic function against a target receptor can autonomously replicate upon autocrine stimulation. In this way, the engineered antibody genes can be recovered by PCR from the chromosomes of selected BaF3 clones.

Methods of screening for antibodies that comprise agonistic function by using autonomous autocrine growth were unknown until now, and hence were newly discovered by the present inventors. The present invention provides agonistic antibody screening methods that use autonomous autocrine replication due to common antibodies, including multi-specific antibodies.

The above-mentioned screening methods first provide cells that express a test antibody and a receptor that multimerizes, where the growth of those cells depends on a factor of that receptor (step A). Next, where the cells undergo autonomous autocrine replication, the test antibodies are judged to comprise agonistic function (step B). Antibodies that comprise agonistic function are then selected (step C).

The above-mentioned methods are not particularly limited to the screening of multi-specific agonistic antibodies, and screening for agonistic antibodies that do not show multi-specificity is also comprised in the above-mentioned methods.

It is commonly known that light chains do not have much effect on antibody specificity. Thus, even when antibodies are multi-specific, the above-mentioned methods can be carried out without introducing two types of heavy chains and two types of light chains into cells. The above-mentioned methods can also be carried out by introducing two kinds of heavy chain libraries into cells after pre-expressing one kind of light chain. Thus, a preferable embodiment of the present invention, in addition to steps (A) to (C), comprises the step of introducing genes that code for a test antibody's heavy chain into the cells of step (A), which have been introduced with a gene coding for the receptor, and a gene coding for the test antibody's light chain.

In addition, the present invention provides methods for producing agonistic antibodies that use the methods of screening for agonistic antibodies of the present invention.

In the above methods, agonistic antibodies are first screened by the methods of screening for agonistic antibodies of the present invention, and genes that code for the agonistic antibodies selected by this screening are introduced into host cells. Multi-specific agonistic antibodies are then recovered from those host cells or their culture.

The antibodies of the present invention, obtained as above, can be isolated using signal sequences from inside cells, or from the culture medium if secreted into the extracellular space. They can then be purified as substantially pure polypeptides. Separation and purification of polypeptides can be performed by appropriately selecting or combining methods as necessary. Separation methods can be selected from those generally used, such as chromatography, filtration, ultrafiltration, salting out, solvent precipitation, solvent extraction, distillation, immunoprecipitation, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric point focusing, dialysis, and recrystallization. Chromatography includes affinity chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reverse phase chromatography, absorption chromatography, and the like (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Course Manual, Harlow and David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)). Such chromatographies may be performed using liquid chromatographies such as HPLC, FPLC, and the like. In addition, since the antibodies of the present invention bind antigens, they may be purified by making use of this ability. Agonistic antibodies isolated and purified in this way are themselves included in the present invention.

The test antibodies in a preferable embodiment of the present invention have their heavy and light chain variable regions linked by linkers, and are introduced with "knobs-into-holes" by amino acid substitution at CH3. Thus, the antibodies provided by the present

invention are preferably agonistic antibodies that are characterized by having their heavy and light chain antibody variable regions linked by linkers, and that are introduced with "knobs-into-holes" by amino acid substitution at CH3 of the antibodies.

5 In the screening methods of the present invention, the agonist activity that can be used as a detection index is preferably proliferation activity. However, it is also possible to use, for example, changes in the amount and/or type of substance produced (secretary proteins, surface antigens, intracellular proteins, mRNA,  
10 etc.), anchorage dependency, cytokine-dependant responsiveness, hormone dependency, drug resistance, cell motility, cell migration activity, pulsatility, changes in intracellular substance, protein phosphorylation, etc.

Agonistic antibodies that can be acquired by the screening  
15 methods of the present invention can be pharmaceutical agents for immunotherapy or prevention, in the same way as traditionally known multi-specific antibodies. IL-10, 12, 24, 4, 7, 9, 13, TSLP, IFN $\alpha$ ,  $\beta$  and such are known as ligands for immune system receptors made up of heterodimers. NGF, GDNF, NT-3, 4 and 5 are known as ligands for  
20 nervous system receptors. Antibodies acquired by the methods of the present invention can be, for example, antibodies that comprise an above-mentioned ligand-like function. The antibodies acquired by the methods of the present invention are expected to become pharmaceuticals for therapy of immune or nervous system illnesses  
25 and such.

Pharmaceutical compositions used for such therapeutic or preventive purposes, which comprise antibodies of the present invention as active ingredients, may be formulated by mixing with suitable pharmaceutically acceptable carriers and solvents, if  
30 necessary, that are inactive against the antibodies. For example, sterilized water, saline, stabilizers, vehicles, antioxidants (e.g. ascorbic acid), buffers (e.g. phosphate, citrate, other organic acids), preservatives, detergents (e.g. PEG, Tween), chelating agents (e.g. EDTA), and binders may be used. Alternatively, they may  
35 comprise other low molecular weight polypeptides, proteins such as serum albumin, gelatin and immunoglobulins, amino acids such as

glycine, glutamine, asparagine, arginine, and lysine, carbohydrates and sugars such as polysaccharides and monosaccharides, and sugar alcohol such as mannitol and sorbitol. When prepared as an aqueous solution for injection, saline and isotonic solutions comprising glucose and other adjunctive agents such as D-sorbitol, D-mannose, D-mannitol, and sodium chloride may be used. In addition, an appropriate solubilizing agent such as alcohol (e.g. ethanol), polyalcohol (e.g. propylene glycol, PEG), and non-ionic detergents (e.g. polysorbate 80, HCO-50) may be used in combination.

If necessary, antibodies of the present invention may be encapsulated in microcapsules (microcapsules made of hydroxycellulose, gelatin, polymethylmethacrylate, and the like), and made into components of colloidal drug delivery systems (liposome, albumin microsphere, microemulsion, nano-particles, and nano-capsules) (refer to, for example, "Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)). Moreover, methods for making sustained-transduce drugs are known, and these can be applied for the antibodies of the present invention (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982); USP: 3,773,919; EP Patent Application No. 58,481; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP: 133,988).

Administration to patients may be preferably performed by injections or intravenous drips; for example, in addition to intra-arterial injections, intravenous injections, and subcutaneous injections, methods known to one skilled in the art may be used, such as administering intranasally, intrabronchially, intramuscularly, percutaneously, or orally. Doses may vary depending on various factors, including patient body weight and age, type of disease, symptoms, and administration method, but those skilled in the art are able to appropriately select suitable doses.

In addition, genes encoding antibodies of the present invention may be used for gene therapy by cloning into vectors for such use. Such vectors can be administered by direct injection using naked plasmids, and also by packaging in liposomes, producing as a variety of viral vectors such as retrovirus vectors, adenovirus vectors, vaccinia virus vectors, poxvirus vectors, adenoassociated virus

vectors, and HVJ vector (Adolph, "Virus Genome Methods", CRC Press, Florida (1996)), or coating onto carrier beads such as colloidal gold particles (e.g. WO93/17706). However, any method can be used for administration as long as the antibodies are expressed *in vivo* and exercise their function. Preferably, a sufficient dose may be administered by a suitable parenteral route (such as injecting intravenously, intraventricularly, subcutaneously, percutaneously, or into adipose tissues or mammary glands, inhalation, intramuscular injection, infusion, gas-induced particle bombardment (using electron gun and such), or through the mucosa (for example, by nose drops). Alternatively, genes encoding antibodies of the present invention may be administered into, for example, blood cells and bone marrow cells *ex vivo* using liposome transfection, particle bombardment (USP: 4,945,050), or viral infection, and the cells may be reintroduced into animals.

#### Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a graph showing CM-dependent growth of an autonomously replicating cell line. 200 $\mu$ L of various concentrations of culture supernatants of MPL-expressing BaF3 cells that acquired autonomous replication by viral infection, was added to each well containing 10,000 washed MPL-expressing BaF3 cells (cells expressing chimeric receptors of the MPL extracellular region, and GCSF receptor transmembrane/intracellular region: TPG). After three days, 20 $\mu$ L of SF reagent (Nakarai) for measuring the viable cell number was added. After two and a half hours, absorbance was measured at 450 nm, and the number of viable cells was investigated. MPL-expressing BaF3 cells (HL(TPG) and LH(TPG)) maintained cell growth in a culture supernatant concentration-dependant manner. On the other hand, parent cell lines BaF3 (HL(BaF3) and LH(BaF3)), which do not express receptors, did not grow, since the antibodies do not act on these cells. The x-axis shows CM concentration (%). The z-axis shows absorbance at 450-655 nm.

#### Best Mode for Carrying Out the Invention

Herein below, the present invention will be specifically



described with reference to Examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

Example 1: Autocrine growth by diabodies

- 5 As a model of agonistic antibodies, the anti-mpl-monoclonal antibody 12E10 (WO99/10494) was used. An *EcoRI*-*NotI* fragment encoding a diabody was excised from pCOSscl2E10 (WO01/79494, WO02/33072) encoding the antibody 12E10 variable region. This fragment was inserted between the *EcoRI* and *NotI* of viral vector
- 10 plasmid pMX. This plasmid pMXscl2E10 was transfected into Pt-E packaging cells using FuGene6 (Roche). Pt-E cells were seeded in 6 cm dishes containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FCS). The next day a mixture of FuGene6 and plasmid pMXscl2E10 was added to the culture. A day after that, the
- 15 culture medium was replaced, and the culture supernatant was collected after 24 hours. 10µg/mL of Polybrene (Hexadimethrine Bromide, Sigma) was added to culture supernatant containing the recombinant virus, target cells were suspended in this culture supernatant and infected. Human MPL cDNA was introduced into factor-dependent cell line BaF3.
- 20 Cell line MPL/BaF3 (cells expressing chimeric receptors of the MPL extracellular region, and GCSF receptor transmembrane/intracellular region), which can grow due to the addition of MPL ligand (thrombopoietin), was infected by adding a viral solution with mouse interleukin-3 (IL-3). The next day the cells were washed with PBS.
- 25 Culture was continued in factor-free RPMI with 10% FCS, and autonomously replicating cells were obtained. Where the culture supernatant of these cells was collected and added to different MPL/BaF3 for incubation, a cell growth dependant on the concentration of the added culture supernatant was observed. From this it was clear
- 30 that the autonomous replication of virus-infected cells was due to the autocrine stimulation of diabodies secreted into the culture medium by these cells.

Example 2: Autocrine growth by scFv-CH1-Fc

- 35 PCR was carried out using pCOSscl2B5 as a template, and primers *EcoRI*-HL (5'- GGAATTCGCCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCT -3' :

SEQ ID NO: 1) and HL-SfiI (5'-GCATGCATGGCCCCGAGGCCACTCACCTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAA -3': SEQ ID NO: 2). An scFv (H-L) gene comprising an EcoRI site at its 5' and a splice donor sequence and SfiI site at its 3' was obtained.

- 5 In addition, to obtain a gene connected in the light-heavy (L-H) chain order, PCR was carried out using pCOSsc12B5 as a template, and a primer combination of 5Hs (5'-GGCGCGCGCGCTCCGGTGGTGGTGGATCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG -3': SEQ ID NO: 3) and 3Ha-SfiI (5'-GCATGCATGGCCCCGAGGCCACTCACCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCCTT -3': SEQ ID NO: 4); or 5Ls (5'-AGTCAGTCGGCCAGCCGCCCATGGCGGACTACAAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCT -3': SEQ ID NO: 5) and 3La (5'-GGAGCCGCGCGCCGAGAACCCACCACCAGAACCCACCACCTTTGATCTCCAGCTTGGTCCTCCGCGGAAA -3': SEQ ID NO: 6). By again carrying out PCR on both obtained amplification products using primers 5Hs and 3La, the amplification products were assembled. The produced LH comprised an SfiI site on both ends, and a splice donor site at the 3' side.

- PCR was carried out using plasmid HEF-1.24H-gyl (WO99/18212) as a template, which comprises a human IgG1 constant region gene. The intron before CH1 and CH1; hinge (primers EcoSfiI (5'-TCGAATTCGGCTCGGGGCCAGCTTTCTGGGCGAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTT -3': SEQ ID NO: 7), and HigeCH1a (5'-CACGGTGGGCATGTGTGAGTTTGTGCACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTGTCACCTTG -3': SEQ ID NO: 8)); CH2 (primers HigeCh2s (5'-CAAACTCACATGCCCCCGTGGCCAGCACCTGAATCTTGGGGGACCGTCAGTCTT -3': SEQ ID NO: 9), and Ch3Ch2a (5'-ACACTGTGGTTCTCGGGCTGCCCTTTGGCTTTGGAGATGGTTTCTCGATG -3': SEQ ID NO: 10)); CH3 (primers Ch2Ch3sW (5'-GGCAGCCCCGAGAACCCAGGTGTACACC -3': SEQ ID NO: 11), and StopNotI (5'-TAGCGCGCGCTCATTTACCCGGAGACAGGAGAGGCTCTT -3': SEQ ID NO: 12)) were amplified. By continuing with this assembly PCR, an IgG1 constant region gene comprising an EcoRI site, an SfiI site, and an intron at its 5', and a NotI site at its 3' was constructed.

- 35 PCR was carried out using mouse interleukin(IL)-3 cDNA as a template, and primers IL3sEcoA (5'-

CGGAATTCGGCCGGCTGGGCCAGCATCAGGAGCAGGAGCAGC -3': SEQ ID NO: 13), and BamIL3ss (5'- GCGGATCCGCCGCCACCATGGTTCTTGCCAGCTCTAC -3': SEQ ID NO: 14), and an IL3 signal sequence (ss) gene comprising a *Bam*HI site at its 5', and an *Sfi*I site and *Eco*RI site at the 3' was obtained.

5 The synthesized IgG1 constant region gene was inserted in the *Eco*RI-NotI site of a retroviral vector pMX, and pMX-CHwild was constructed. pMX-HL-CHwild was obtained by incorporating the scFv (H-L) gene into the *Eco*RI-*Sfi*I site of the pMX-CHwild plasmid. When the virus derived from this plasmid infects cells, molecules used  
10 as antibodies, which have CH1-hinge-CH2-CH3 linked with the scFV (H-L) C-terminal of antibody 12B5, can be expected to be secreted. Then, IL3ss was incorporated into the *Bam*HI-*Eco*RI site of pMX-CHwild, and scFv(L-H) was further incorporated into the *Sfi*I site to construct pMX-IL3ss-LH-CHwild. ScFv-CH1-hinge-CH2-CH3 (L-H) can be expected  
15 to be secreted by this plasmid-derived virus. The above plasmids were respectively transfected into Pt-E cells, as above. Recombinant viruses were obtained and used to infect MPL/BaF3 cells. The next day, factors were removed by washing, and culture was continued. As a result, cells that can replicate autonomously were obtained. The  
20 culture supernatant of these cells was collected, and on culturing with different MPL/BaF3s, cell growth dependant on the concentration of culture supernatant added was observed (Figure 1, TPG). On the other hand, parent line BaF3 did not express the receptors, and thus did not proliferate as antibodies did not act on them (Figure 1, BaF3).  
25 From this, the autonomous replication of virus-infected cells was revealed to be due to the autocrine stimulation of scFv-CH1-hinge-CH2-CH3 secreted into the medium by those cells.

#### Industrial Applicability

30 The present invention provides novel methods that can effectively screen for agonistic antibodies. In a preferable embodiment of the present invention, screening is made easily possible by using antibodies as libraries, without the need for complicated procedures. In addition, in a preferable embodiment of the present  
35 invention, autonomous autocrine replication is used as an index for screening. Since only clones that secrete agonistic antibodies

themselves are selected as cells that have reproduced via receptor signals, multiple samples (antibody libraries) can be treated simultaneously, and extremely effectively.

## CLAIMS

1. A method of screening for agonistic antibodies that comprises the following steps (a) to (c):
  - 5 (a) providing a cell that expresses a multimer-forming receptor and a test antibody, where the cell grow depending on a factor of the receptor;
  - (b) determining the test antibody to comprise agonistic function when autocrine cell growth is autonomous; and
  - 10 (c) selecting those antibodies that comprise agonistic function.
2. The method of claim 1 that further comprises the step of introducing a gene that encodes the heavy chain of the test antibody into the cell of step (a) having been introduced with a gene that encodes the light chain of the test antibody and a gene that encodes  
15 the receptor.
3. The method of claim 1 or 2 where the receptor is a chimeric receptor with a protein that comprises a function of transducing a cell growth signal.
4. The method of any one of claims 1 to 3 where the receptor is a  
20 dimer-forming receptor.
5. The method of claim 4 where the dimer-forming receptor is a homo-dimer.
6. The method of claim 4 where the dimer-forming receptor is a hetero-dimer.
- 25 7. The method of any one of claims 1 to 6 where the protein that comprises the function of transducing a cell growth signal is a G-CSF receptor.
8. The method of any one of claims 1 to 7 that comprises the introduction of an antibody library to the cell.
- 30 9. The method of claim 8 where the antibody library is a retroviral antibody library.
10. The method of any one of claims 1 to 9 where the test antibody is a multi-specific antibody.
11. The method of claim 10 that comprises linking the test antibody's  
35 heavy and light chain variable regions with a linker.
12. The method of claim 11 that comprises producing the antibody with

variable regions linked by a linker, using a method that comprises the steps (a) to (c):

- (a) producing a single chain Fv against the first receptor chain;
- (b) producing a single chain antibody against the first receptor chain by linking the single chain Fv with a CH1-hinge-CH2-CH3; and
- (c) producing a multi-specific antibody that comprises the single chain antibody produced in step (b).

13. The method of claim 11 that comprises producing the antibody with its variable regions linked by a linker, using a method that comprises the steps (a) to (c):

- (a) producing a single chain Fab against the first receptor chain;
- (b) producing a single chain antibody against the first receptor chain by linking the single chain Fab with an Fc; and
- (c) producing a multi-specific antibody that comprises the single chain antibody produced in step (b).

14. A method of screening for an agonist multi-specific antibody that comprises the steps (a) to (c):

- (a) contacting between a multi-specific antibody and a receptor comprising a first receptor chain and a second receptor chain, where the multi-specific antibody comprises a variable region that can bind with the first receptor chain and a variable region that can bind with the second receptor chain;
- (b) determining whether the test multi-specific antibody comprises agonistic function; and
- (c) selecting antibodies that comprise agonistic function.

15. The method of claim 14 that comprises expressing the receptor and the test multi-specific antibody in the same cell.

16. The method of claim 15 where the cell is a cell that grows depending on a receptor factor.

17. The method of claim 15 or 16 where the receptor comprises the function of transducing a cell growth signal.

18. The method of claim 17 where the receptor is a chimeric receptor with a protein that comprises the function of transducing a cell growth signal.

19. The method of claim 18 where the protein that comprises the function of transducing a cell growth signal is a G-CSF receptor.

20. The method of any one of claims 15 to 19 where the test multi-specific antibody is determined to comprise agonistic function when autocrine cell growth is autonomous.

5 21. The method of any one of claims 15 to 20 that further comprises the step of introducing an antibody library against the first receptor chain and the second receptor chain into the cell, respectively.

22. The method of claim 21 where the antibody library is a retroviral antibody library.

10 23. The method of any one of claims 14 to 22 that comprises linking the light chain variable regions and heavy chain variable regions of the multi-specific antibody with a linker.

24. The method of claim 23 that comprises producing a multi-specific antibody with variable regions linked by a linker, using a method that comprises steps (a) to (c):

15 (a) producing a single chain Fv against the first receptor chain;  
(b) producing a single chain antibody against the first receptor chain by linking the single chain Fv with a CH1-hinge-CH2-CH3; and  
(c) producing a multi-specific antibody that comprises the single chain antibody produced in step (b).

20 25. The method of claim 23 that comprises producing the multi-specific antibody with variable regions linked by a linker, using a method that comprises steps (a) to (c):

(a) producing a single chain Fab against the first receptor chain;  
25 (b) producing a single chain antibody against the first receptor chain by linking the single chain Fab with an Fc; and  
(c) producing a multi-specific antibody that comprises the single chain antibody produced in step (b).

30 26. The method of any one of claims 14 to 25 that comprises the introduction of "Knobs-into-holes" by amino acid substitution at the multi-specific antibody CH3.

27. The method of any one of claims 14 to 26 where the multimer is a heterodimer.

28. The method of any one of claims 14 to 27 where the multi-specific antibody is a bispecific antibody.

35 29. A method for producing an agonistic antibody comprising steps (a) to (c):

(a) screening for an agonistic antibody by a method of any one of claims 1 to 28;

(b) introducing a gene that encodes the agonistic antibody selected by the screening of step (a) into a host cell;

- 5 (c) recovering the agonistic antibody from the host cell of step (b) or its cell culture supernatant.

30. A cell that expresses an antibody, and a receptor that multimerizes by binding with the antibody, where the cell grow depending on a factor of the receptor.

- 10 31. The cell of claim 30 where the receptor is a chimeric receptor with a protein that comprises the function of transducing a cell growth signal.

32. The cell of claim 30 or 31 where the antibody is a multi-specific antibody.

- 15 33. The cell of any one of claims 30 to 32 where the receptor that is multimerized by binding with the antibody comprises the function of transducing a cell growth signal.

34. A multi-specific agonistic antibody that comprises the linking of the light chain variable region and heavy chain variable region  
20 by linkers, and the introduction of "Knobs-into-holes" by amino acid substitution at the antibody CH3.



## ABSTRACT

Cell strains with ligand-dependent (factor-dependent) proliferation are super-infected with antibody libraries against each  
5 of the various receptor chains. Antibody genes are recovered from strains that autonomously grow by the autocrine stimulation by agonistic antibodies formed by appropriate combinations, enabling effective screening of agonistic antibodies. In this method, effective screening can be carried out using antibodies as libraries.  
10 Furthermore, the manipulations are simple, and there is no need for complicated operations.

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年11月6日 (06.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/091424 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/00, C07K 16/44, C12N 5/10, C12P 21/08, C12Q 1/02, G01N 33/50, 33/15, A61K 39/395, A61P 25/00, 37/00

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/05372

(81) 指定国/国内: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2003年4月25日 (25.04.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-127260 2002年4月26日 (26.04.2002) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小嶋 哲郎 (KOJIMA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 妹尾 千明 (SENOO, Chiaki) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING AGONISTIC ANTIBODY

WO 03/091424 A1

(54) 発明の名称: アゴニスト抗体のスクリーニング方法

(57) Abstract: An agonistic antibody can be efficiently screened by superinfecting a cell strain, which proliferates depending on a ligand (factor), with antibody libraries respectively to various receptor chains and collecting an antibody gene from an autonomously growing strain by autocrine of an agonistic antibody formed from an appropriate combination. Since antibodies are used as libraries in this method, the screening can be performed efficiently and conveniently without resort to troublesome operations.

(57) 要約: リガンド (因子) に依存して増殖する細胞株に多種の受容体鎖それぞれに対する抗体ライブラリーを重感染させ、適切な組み合わせによって生じるアゴニスト抗体のオートクラインによる自律増殖株から抗体遺伝子を回収することにより、効率的にアゴニスト抗体をスクリーニングすることができる。該方法は、抗体をライブラリーとして用いることにより、効率的にスクリーニングを行うことができ、さらに、操作も簡便であり、煩雑な作業を必要としない。

-1-

## 明細書

## アゴニスト抗体のスクリーニング方法

## 5 技術分野

本発明は、アゴニスト抗体の新規スクリーニング方法に関する。

## 背景技術

抗体は血中での安定性が高く、抗原性もないことから医薬品として注目されている。その中でも二種類の抗原を同時に認識できる bispecific 抗体が提唱されて久しいが、現状では二種類の抗原を単に繋ぐのみである。しかし抗体は抗原中の特定のエピトープに結合するため、適当な抗体の組み合わせを選べば2つの抗原を望む距離・角度に配位することが出来ると考えられる。

多くのサイトカインの受容体はリガンドが結合することによってホモ・ヘテロ二量体を形成する鎖間の距離・角度が変化して細胞内にシグナルを伝えようようになると考えられている。つまり適当な抗受容体抗体はリガンドによる受容体の二量体化を模倣でき、アゴニスト抗体となりうる。既にホモ二量体から成る MPL に対してアゴニスト作用を示すモノクローナル抗体が報告されている (Blood 1998 Sep 15;92(6):1981-8・US98/17364)。ただし、このようなアゴニスト抗体を得るためには膨大な種類の抗体から選択する必要があり、効果的な選択方法が求められる。

従来は、抗原つまり受容体鎖に結合する抗体を選択し、そのリガンドに反応する適当な細胞アッセイ系に抗体を加えることによって検定しなければならなかった。ヘテロ二量体を形成する受容体の場合はさらに煩雑になり、受容体を構成する二種の鎖 (A, B) それぞれに対する抗体を選択し、あらゆる A, B の組み合わせについてひとつひとつ検定を行わなければならない。また二価抗体を産生させる

- ためには、抗体産生ハイブリドーマ同士の融合、もしくは全ての抗体についての発現ベクターの作製・全ての組み合わせでの細胞への導入が必要になる。A, B 鎖それぞれに対する抗体を 100 種類ずつ検討すると 10000 通りの組み合わせの検定が必要になり、L 鎖、H 鎖合わせて 400 種類の発現ベクターの作成、10000 回の細胞への導入が必要になる。Bispecific diabody としてファージ上に提示させたライブラリーを用いる方法もあるが、大腸菌の培養上清を直接細胞培養系に加えることは細胞に対する影響があるため精製が必要となる上、monospecific diabody の混入（理論上 50%）は避けられない。

#### 10 発明の開示

- 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、アゴニスト抗体、特にアゴニスト多種特異性抗体の効率的な新規スクリーニング方法を提供することにある。より詳しくは、細胞のオートクライン増殖を利用したアゴニスト抗体のスクリーニング方法の提供を目的とする。
- 15 本発明者らは上記の課題を解決するために鋭意研究を行った結果、以下のような効果的なアゴニスト抗体のスクリーニング方法を開発した。この方法とは、リガンドに依存して増殖する細胞株に受容体に対する抗体ライブラリーを感染させ、アゴニスト抗体のオートクラインによる自律増殖株から抗体遺伝子を回収し、該遺伝子を基にアゴニスト抗体を作製する方法である。抗体がアゴニスト多種特異性抗体の場合には、リガンドに依存して増殖する細胞株に多種の受容体鎖それぞれに対する抗体ライブラリーを重感染させ、適切な組み合わせによって生じるアゴニスト多種特異性抗体のオートクラインによる自律増殖株から抗体遺伝子を回収し、該遺伝子を基にアゴニスト多種特異性抗体を作製する。より具体的には例えば以下のようにして行うことができる。
- 25 まず、マウスに受容体の A 鎖、B 鎖それぞれを免疫する。この動物の脾細胞から mRNA を抽出し、マウスの CDR に対応するプライマーを用いて RT-PCR にて L 鎖、

H鎖の可変領域を回収する。assembly PCRにて一本鎖Fv(scFv)を合成し、ファージライブラリーを構築する。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮し、その一本鎖可変領域を動物細胞用のシグナル配列とCH1-hinge-CH2-CH3の間に挿入し、レトロウイルス用のプラスミドに組み込んだライブラリーを作製する。

- 5 目的の受容体鎖とG-CSFRの細胞内領域とのキメラ鎖を発現させることにより、そのリガンドで増殖できるようにしたBa/F3細胞を用意し、抗A鎖抗体ライブラリーウイルスを感染させる。さらに抗B鎖抗体ウイルスライブラリーを感染させ、因子を洗浄・除去し培養する。因子依存的に増殖してきた細胞を回収し、クローニングを行い、その培養上清を用いて生理的なアッセイ系にて活性を確認する。
- 10 PCRにてクローンの染色体に組み込まれている抗体CDR遺伝子を回収し、アゴニスト多種特異性抗体の産生に供する。この方法は、抗体をライブラリーとして用いることにより、効率的にスクリーニングを行うことができ、さらに、操作も簡便であり、煩雑な作業を必要としない。

上記の如く本発明者らは、アゴニスト抗体を効率的にスクリーニングできる新規な方法を開発し、本発明を完成させた。

- 15 即ち本発明は、アゴニスト多種特異性抗体の効率的な新規スクリーニング方法に関し、より具体的には、

即ち本発明は、アゴニスト多種特異性抗体の効率的な新規スクリーニング方法に関し、より具体的には、

〔1〕 以下の工程(a)～(c)を含む、アゴニスト抗体のスクリーニング方法、

- 20 (a) 被験抗体、および多量体を形成する受容体を発現する細胞であって、該受容体の因子に依存して増殖する細胞を提供する工程
- (b) 細胞がオートクライン自律増殖する場合に、被験抗体はアゴニスト作用を有するものと判定する工程
- (c) アゴニスト作用を有する抗体を選択する工程

- 25 〔2〕 工程(a)の細胞が、受容体をコードする遺伝子および被験抗体の軽鎖をコードする遺伝子が導入された細胞であり、さらに、被験抗体の重鎖をコー

ドする遺伝子を導入する工程を含む、〔１〕に記載の方法、

〔３〕 受容体が、細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質とのキメラ受容体である〔１〕または〔２〕に記載の方法、

〔４〕 受容体が、二量体を形成する受容体である〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の方法、

〔５〕 二量体を形成する受容体が、ホモ二量体を形成する受容体である〔４〕に記載の方法、

〔６〕 二量体を形成する受容体が、ヘテロ二量体を形成する受容体である〔４〕に記載の方法、

〔７〕 細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質がＧ－ＣＳＦ受容体である、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の方法、

〔８〕 抗体ライブラリーを、細胞へ導入することを特徴とする、〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の方法、

〔９〕 抗体ライブラリーがレトロウイルス抗体ライブラリーである、〔８〕に記載の方法、

〔１０〕 被験抗体が多種特異性抗体である〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の方法、

〔１１〕 被験抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域がリンカーで結ばれていることを特徴とする〔１０〕に記載の方法、

〔１２〕 可変領域がリンカーで結ばれている抗体が、以下の工程（ａ）～（ｃ）を含む方法により作製されることを特徴とする、〔１１〕に記載の方法、  
（ａ）第一の受容体鎖に対する一本鎖Ｆｖを作製する工程  
（ｂ）該一本鎖ＦｖをＣＨ１－ｈｉｎｇｅ－ＣＨ２－ＣＨ３に結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体を作製する工程

（ｃ）工程（ｂ）で作製された一本鎖抗体を含む多種特異性抗体を作製する工程  
〔１３〕 可変領域がリンカーで結ばれている抗体が、以下の工程（ａ）～

- (c) を含む方法により作製されることを特徴とする、〔11〕に記載の方法、
- (a) 第一の受容体鎖に対する一本鎖Fabを作製する工程、
- (b) 該一本鎖FabをFcに結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体を作製する工程、
- 5 (c) 工程(b)で作製された一本鎖抗体を含む多種特異性抗体を作製する工程
- 〔14〕 以下の工程(a)～(c)を含む、アゴニスト多種特異性抗体のスクリーニング方法、
- (a) 第一の受容体鎖と第二の受容体鎖を有する受容体の、該第一の受容体鎖に結合し得る可変領域および該第二の受容体鎖に結合し得る可変領域を含む被験多
- 10 種特異性抗体を、該受容体に接触させる工程
- (b) 被験多種特異性抗体がアゴニスト作用を有するか否かを判定する工程
- (c) アゴニスト作用を有する抗体を選択する工程
- 〔15〕 受容体、および被験多種特異性抗体を同一の細胞で発現させることを特徴とする〔14〕に記載の方法、
- 15 〔16〕 細胞が、受容体の因子に依存して増殖する細胞である、〔15〕に記載の方法、
- 〔17〕 受容体が細胞増殖シグナルを発する機能を有する、〔15〕または〔16〕に記載の方法、
- 〔18〕 受容体が、細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質との
- 20 キメラ受容体である〔17〕に記載の方法、
- 〔19〕 細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質がG-CSF受容体である、〔18〕に記載の方法、
- 〔20〕 細胞がオートクライン自律増殖する場合に、被験多種特異性抗体はアゴニスト作用を有するものと判定される、〔15〕～〔19〕のいずれかに記載の方法、
- 25 〔21〕 第一の受容体鎖および第二の受容体鎖に対するそれぞれの抗体ライ

ブラリーを、細胞へ導入する工程をさらに含む、〔15〕～〔20〕のいずれかに記載の方法、

〔22〕 抗体ライブラリーがレトロウイルス抗体ライブラリーである、〔21〕に記載の方法、

- 5   〔23〕 多種特異性抗体の軽鎖と重鎖の変領域がリンカーで結ばれていることを特徴とする〔14〕～〔22〕のいずれかに記載の方法、

〔24〕 変領域がリンカーで結ばれている多種特異性抗体が、以下の工程（a）～（c）を含む方法により作製されることを特徴とする、〔23〕に記載の方法、

- 10   （a）第一の受容体鎖に対する一本鎖Fvを作製する工程  
（b）該一本鎖FvをCH1-hinge-CH2-CH3に結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体を作製する工程  
（c）工程（b）で作製された一本鎖抗体を含む多種特異性抗体を作製する工程

- 〔25〕 変領域がリンカーで結ばれている多種特異性抗体が、以下の工程  
15   （a）～（c）を含む方法により作製されることを特徴とする、〔23〕に記載の方法、

（a）第一の受容体鎖に対する一本鎖Fabを作製する工程、  
（b）該一本鎖FabをFcに結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体を作製する工程、

- 20   （c）工程（b）で作製された一本鎖抗体を含む多種特異性抗体を作製する工程

〔26〕 多種特異性抗体のCH3に、アミノ酸置換によってKnobs-into-holesが導入されていることを特徴とする、〔14〕～〔25〕のいずれかに記載の方法、

- 〔27〕 多量体がヘテロ二量体である、〔14〕～〔26〕のいずれかに記載の方法、  
25   載の方法、

〔28〕 多種特異性抗体が、二種特異性抗体である、〔14〕～〔27〕の



いずれかに記載の方法、

- [29] 以下の工程(a)～(c)を含むアゴニスト抗体を製造する方法、  
(a) [1]～[28]のいずれかに記載の方法により、アゴニスト抗体をスクリーニングする工程、  
5 (b) 工程(a)のスクリーニングにより選択されるアゴニスト抗体をコードする遺伝子を宿主細胞へ導入する工程、  
(c) 工程(b)の宿主細胞、または該細胞の培養液から、アゴニスト抗体を回収する工程
- [30] 抗体、および該抗体との結合により多量体化する受容体を発現する  
10 細胞であって、該受容体の因子に依存して増殖する細胞、
- [31] 受容体が、細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質とのキメラ受容体である[30]に記載の細胞、
- [32] 抗体が多種特異性抗体である[30]または[31]に記載の細胞、  
[33] 抗体との結合により多量体化した受容体が、細胞増殖シグナルを発  
15 する機能を有する、[30]～[32]のいずれかに記載の細胞、
- [34] 抗体の軽鎖と重鎖の可変領域がリンカーで結ばれ、かつ抗体のCH3に、アミノ酸置換によってKnobs-into-holesが導入されていることを特徴とするアゴニスト多種特異性抗体、を提供するものである。
- なお、本明細書において規定された用語の定義は、本明細書中で使用される用語  
20 語の理解を容易にする目的で記載されたものであり、本発明を限定する目的で用いられるべきではないことは理解されたい。
- 本発明は、アゴニスト抗体の効率的な新規スクリーニング方法を提供する。本方法においては、まず、受容体に結合し得る可変領域を含む被験抗体を、該受容体に接触させる(工程(a))。
- 25 本発明において、抗体が多種特異性抗体の場合には、第一の受容体鎖と第二の受容体鎖を有する受容体の、該第一の受容体鎖に結合し得る可変領域および該第

二の受容体鎖に結合し得る可変領域を含む被験多種特異性抗体を、該受容体に接触させる（工程（a））。

- アゴニスト抗体とは、ある受容体に対して、アゴニスト作用を有する抗体を指す。一般的に、アゴニストであるリガンド（因子）が受容体と結合すると、受容体タンパク質の立体構造が変化し、受容体が活性化（受容体が膜タンパク質である場合には、通常、細胞増殖等のシグナルを発する）される。二量体を形成するタイプの受容体である場合には、アゴニスト抗体は適切な距離、角度で受容体を二量体化させることにより、リガンドと同様の働きをすることができる。つまり適当な抗受容体抗体はリガンドによる受容体の二量体化を模倣でき、アゴニスト抗体となり得る。

- 多種特異性抗体とは、異なる多種の抗原と特異的に結合し得る抗体を言う。つまり多種特異性抗体は、少なくとも2種類の異なる抗原に対して特異性を有する抗体である。通常、このような分子は2個の抗原と結合するものであるが（すなわち二重特異性抗体）、本明細書中では「多種特異性抗体」は、それ以上（例えば、3種類の）抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。多種特異性抗体は全長から成る抗体、またはそのような抗体の断片（例えば、F(ab')<sub>2</sub>、二種特異性抗体）であり得る。多種特異性抗体は、免疫診断、治療および免疫学的検定による診断等の臨床分野において有用である。本発明における多種特異性抗体としては、例えば、二種の抗原と特異的に結合し得る二種特異性抗体を好適に示すことができる。通常、抗原がヘテロ受容体である場合には、二種特異性抗体は、ヘテロ受容体を構成する2本のポリペプチド鎖をそれぞれ認識する。

本発明におけるアゴニスト多種特異性抗体とは、上記のアゴニスト抗体と多種特異性抗体の両方の性質（特徴）を有する抗体を指す。

- 本発明の好ましい態様においては、まず、本発明のスクリーニング方法に供する被験抗体の調製を行う。しかしながら、この被験抗体の調製は、必ずしも必須の工程ではなく、すでに公知の化合物、または天然に存在する抗体（様）分子あ

るいは該抗体分子の断片等を本発明の被験抗体とすることも可能である。

本発明において、被験抗体にはどのような抗体を用いてもよく、特に限定はされないが、多種特異性抗体であることが好ましく、さらに二種特異性抗体であることが好ましい。

- 5      また、本発明のアゴニスト抗体が結合してシグナルを伝達する受容体は、どのような受容体を用いてもよく、特に限定されない。受容体の好ましい例としては、細胞膜受容体を挙げることができ、さらに好ましくは多量体を形成する受容体であり、特に好ましくは二量体を形成する受容体（例えば、ヘテロ受容体）である。

- 本発明の上記被験抗体は、通常、動物に対して抗原を免疫化することにより調製することができる。動物を免疫化する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原（ハプテンを含む）が挙げられる。本発明においては、スクリーニングしたいアゴニスト抗体がリガンドとして作用すると考えられる受容体を、上記抗原（免疫原）として使用する。本発明における上記受容体は特に制限されないが、通常、多量体であり、好ましくは二量体である。
- 10   量体には、同一の受容体鎖で構成されるホモ二量体と、異なる受容体鎖で構成されるヘテロ二量体がある。より好ましくはヘテロ二量体である。免疫化する動物として、例えば、マウス、ハムスター、またはアカゲザル等を用いることができる。これら動物に対して、抗原を免疫化することは、当業者においては、周知の方法によって行うことができる。本発明において好ましくは、免疫化された動物
- 15   または該動物の細胞から抗体のL鎖およびH鎖の変領域の回収を行う。この操作は、当業者においては一般的に公知の技術を用いて行うことができる。抗原によって免疫化された動物は、とりわけ脾臓細胞において該抗原に対する抗体を発現する。従って、例えば、免疫化された動物の脾臓細胞からmRNAを調製し、該動物のCDRに対応するプライマーを用いて、RT-PCRによりL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行うことができる。ここで、CDRとは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する3つの領域（CDR1、CDR2、CDR3）
- 20   25

- を指す。CDRに対応するプライマーとしては、例えば、CDRよりも多様性の低いフレームワークに対応するプライマー、あるいはシグナル配列とCH1、CL部分に対応するプライマーを用いることができる。また、*in vitro*においてリンパ球を免疫化することもできる。その後、免疫化された動物の脾臓またはリンパ球中に含まれる抗体をコードするDNAを、慣用の方法、例えば、抗体重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるヌクレオチドプローブ等を用いる方法により単離する。

- 免疫原とする受容体は、該受容体を構成するタンパク質全体、もしくは該タンパク質の部分ペプチドであってもよい。本発明における好ましい態様においては、
- 10 受容体がヘテロ受容体の場合、ヘテロ受容体の一部を構成する部分ペプチド鎖において、2種以上の異なる部分ペプチド鎖を免疫原として使用する。本発明においては、異なる部分ペプチド鎖を、それぞれ「第一の受容体鎖」および「第二の受容体鎖」と記載する。本発明の受容体が二量体を形成する場合には、上記の「第一の受容体鎖」または「第二の受容体鎖」はそれぞれ、該二量体の各サブユニットを構成するペプチド鎖（または該ペプチド鎖の部分ペプチド）であることが好ましい。例えば、A鎖とB鎖の2種のペプチド鎖からなるヘテロ受容体の場合、A鎖（又はその部分ペプチド）が「第一の受容体鎖」となり、B鎖（又はその部分ペプチド）が「第二の受容体鎖」となることが好ましい。これらの第一の受容体鎖および第二の受容体鎖を免疫原として、動物へ免疫化することにより、
- 20 該第一の受容体鎖に結合し得る可変領域および該第二の受容体鎖に結合し得る可変領域を含む被験抗体を調製することができる。

- また、動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。受容体のような膜貫通分子を抗原として用いる場合、
- 25 これらの断片（例えば、受容体の細胞外領域）を用いるのが好ましい。また、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とすることもできる。このような細

胞は天然（腫瘍セルライン等）由来、または、組換え技術により膜貫通分子を発現するように構成された細胞であってもよい。

- 本発明の上記スクリーニング方法の好ましい態様においては、まず、アゴニスト抗体がアゴニストとして作用する受容体のリガンド（因子）に依存して増殖する細胞に、受容体それぞれに対するウイルス抗体ライブラリーを感染させる。該ライブラリーが感染した細胞において、受容体に対する抗体が産生する。本発明においては、上記細胞において生成される抗体を本発明の「被験抗体」として、本発明のスクリーニング方法へ供される。抗体が多種特異性抗体の場合には、アゴニスト多種特異性抗体がアゴニストとして作用する受容体のリガンド（因子）に依存して増殖する細胞に、多種の受容体鎖それぞれに対するウイルス抗体ライブラリーを重感染させる。該ライブラリーが重感染した細胞において、適切なペプチド鎖の組み合わせによって生じる多種の受容体鎖に対する抗体が産生する。

- 本発明の上記細胞は、通常、真核生物由来の細胞であり、好ましくは動物細胞であり、より好ましくはヒト由来の細胞である。本発明の一つの態様においては、被験抗体を発現させる細胞において、上記受容体（アゴニスト抗体がアゴニストとして作用する受容体）もまた発現させることが好ましい。従って本発明の好ましい態様においては、受容体、および被験抗体を同一の細胞で発現させることを特徴とする。このとき、細胞から分泌された被験抗体が、受容体と結合しアゴニスト作用を有する場合には、該受容体が細胞増殖シグナルを発し、該細胞がオートクライン（autocrine）自律増殖する。オートクライン自律増殖とは、細胞自身が生産する物質を増殖シグナルとして、細胞が自立的に増殖する現象を言う。このようにオートクライン自律増殖をするか否かを指標とすることにより、アゴニスト多種特異性抗体をスクリーニングすることができる。本発明の好ましい態様においては、被験抗体および受容体が発現した細胞がオートクライン自律増殖する場合に、被験抗体はアゴニスト作用を有するものと判定される。

また、以下のような指標により、本発明の被験抗体のアゴニスト作用を判定す

ることができる。

(1) 因子依存的に増殖する細胞の培養時に抗体サンプルを添加することによって因子同様に細胞が増殖するか否かを指標とする。細胞が増殖する場合に、被験抗体は、アゴニスト作用を有するものと判定される。

- 5 (2) 因子の本来の活性（増殖とは限らない）を示す細胞株の培養時に加えることによって因子同様の反応を示すか否かを指標とする。因子同様の反応を示す場合に、被験抗体は、アゴニスト作用を有するものと判定される。

- 本発明における上記細胞増殖シグナルを発する細胞は、通常、本発明のスクリーニング方法により選択される抗体がアゴニストとして作用し得る受容体を、細胞表面において発現しており、該受容体のリガンド（例えば、アゴニスト抗体）と結合することにより、細胞増殖シグナルを発する。従って本発明において使用する細胞は、受容体のリガンド（因子）依存的に増殖できる細胞（因子依存性増殖細胞）であることが好ましい。また、本発明の受容体は、通常、リガンドと結合することにより、細胞増殖シグナルを発するものであることが好ましい。しか  
10 し、本発明における受容体が細胞増殖シグナルを出さないタイプのものである場合、該受容体を、細胞増殖シグナルを発するタイプの受容体と融合させ、所謂キメラ受容体とすることにより、本発明に使用することができる。より具体的には、リガンドが結合する受容体の細胞外領域と、増殖シグナルを発するタイプの受容体の細胞内領域を含むキメラ受容体を使用することが可能である。該キメラ受容体は、リガンドと結合することにより、細胞増殖シグナルを発する。リガンドが結合する受容体と融合させることによりキメラ受容体を構築するのに適した受容体は、細胞増殖シグナルを発するタイプの受容体であれば特に制限されず、サイトカイン受容体など、当業者が公知の受容体を用いることができる。受容体の具  
15 体的な例としては、G-CSF 受容体、mpl、neu、GM-CSF 受容体、EPO 受容体、c-Ki  
20 t、FLT-3 等を挙げることができる。本発明における上記因子依存性増殖細胞の好適な例として、具体的には、細胞外がリガンド受容体鎖、細胞内が G-CSF 受容

体鎖であるキメラ受容体を発現させた因子依存性増殖細胞 BaF3 を示すことができる。その他、本発明において使用できる細胞として、例えば、NFS60、FDCP-1、FDCP-2、CTL-2、DA-1、KT-3等を挙げるができる。

- 本発明は上記のような、抗体、および該抗体との結合により多量体化する受容
- 5 体を発現する細胞であって、該受容体の因子に依存して増殖する細胞もまた、本発明に含まれる。

- 本発明の「抗体」には、所謂「免疫グロブリン」が含まれ、さらに、天然の抗体および抗体様分子、抗体断片も含まれる。天然の抗体および免疫グロブリンは、一般的に約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体であり、2本の同じ軽鎖 (L 鎖) お
- 10 よび 2本の同じ重鎖から成る。各軽鎖は、重鎖に1つの共有ジスルフィド結合により連結されているが、重鎖間のジスルフィド結合の数は、免疫グロブリンのアイソタイプの種類によって異なる。重鎖および軽鎖はまた、それぞれ一定間隔の鎖内ジスルフィド橋を有する。各重鎖は一つの末端に可変領域 (VH) を有し、それに連結された多数の定常領域を有する。各軽鎖は一方の末端に可変領域 (VL)
- 15 を有し、他方の末端に定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の最初の定常領域と並んでおり、軽鎖の可変領域は重鎖の可変領域と並んでいる。特定のアミノ酸残基が軽鎖および重鎖の可変領域のインターフェイスを形成していると考えられている (Chothia C, et al: J Mol Biol 186:651-663, 1985, Novotny J, Haber E: Proc Natl Acad Sci USA 82:4592-4596, 1985)。本発明における被験抗体として、具体的には、免疫グロブリン G(IgG) が好適に用いられる。
- 20

- 上記の抗体断片という用語は全長抗体の一部のことであり、一般に抗原結合領域または可変領域を指す。例えば、抗体断片には Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> および Fv 断片が含まれる。抗体のパパイン消化により、Fab 断片と呼ばれる、各1つずつの抗原結合部位を有する2つの同じ抗原結合断片、および残りの、容易に結晶化
- 25 するために「Fc」と呼ばれる断片が生じる。また、ペプシン消化により、2つの抗原結合部位を有し、抗原を交差結合し得る F(ab')<sub>2</sub> 断片、および残りの別な断

片 (pFc' と呼ばれる) が得られる。その他の断片としては、ダイアボディ (diabody)、線状抗体、一本鎖抗体分子および抗体断片より形成された多種特異性抗体が含まれる。本発明において抗体断片とは、例えば、Fv、F(ab) および F(ab')<sub>2</sub> 断片等を指す。

- 5      ここで、「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。この領域は1つの重鎖および軽鎖の可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> ダイマー)。各可変領域の3つの CDR が相互作用し、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> ダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6つの CDR が抗体に抗原結合部位を付与している。しかしながら、1つの可変領域 (または、抗原に特異的な3つの CDR のみを含む Fv の半分) であっても、全結合部位よりも親和性は低い、抗原を認識し、結合する能力を有する。

- また、Fab 断片 (F(ab) と呼ばれる) はさらに、軽鎖の定常領域および重鎖の定常領域 (CH1) を含む。Fab' 断片は、抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含む重鎖 CH1 領域のカルボキシ末端由来の数の残基を付加的に有する点で Fab 断片と異なっている。Fab'-SH とは、定常領域の1またはそれ以上のシステイン残基が遊離のチオール基を有する Fab' を示すものである。F(ab')<sub>2</sub> 断片は、F(ab')<sub>2</sub> ペプシン消化物のヒンジ部のシステインにおけるジスルフィド結合の切断により製造される。化学的に結合されたその他の抗体断片も当業者には知られている。

- 20      本発明においてダイアボディ (diabody; Db) は、遺伝子融合により構築された二価 (bivalent) の抗体断片を指す (P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404,097 号、W093/11161 号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で軽鎖可変領域 (VL) 及び重鎖可変領域 (VH) が、互いに結合できない位に短い、例えば、5 残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされる VL と VH とは、その間のリンカーが短いため単鎖 V 領域フラグ



メントを形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。このとき2つの異なる抗原(a、b)に対するVLとVHをVLa-VHbとVLb-VHaの組合わせで5残基程度のリンカーで結んだものを同時に発現させると二種特異性Dbとして分泌される。

- 5 一本鎖抗体(以下、scFvとも記載する)またはscFv抗体断片には、抗体のVHおよびVL領域が含まれ、これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、FvポリペプチドはさらにVHおよびVL領域の間にポリペプチドリ  
10 ンカーを含んでおり、これによりscFvは、抗原結合のために必要な構造を形成することができる(scFvの総説については、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol.113 (Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp. 269-315, 1994)を参照)。本発明におけるリンカーは、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されない。

- また、遺伝子工学的に非ヒト哺乳動物(マウス、ラット、ハムスター等)由来のモノクローナル抗体のCDR以外の部分をヒト免疫グロブリン由来の可変領域の  
15 枠組構造配列に置き換え「ヒト化抗体」とする技術が公知である(例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); Presta Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)参照)。ヒト化抗体は、レシピエント抗体に導入させたCDRまたは枠組構造配列のどちらにも含まれないアミノ酸残基を含んでいてもよい。通常、このようなアミノ酸残基の導入は、  
20 抗体の抗原認識・結合能力をより正確に至適化するために行われる。本発明の被験抗体における可変領域はヒト化等の改変された可変領域も包含する。

- 本発明において抗体ライブラリーによって細胞において発現させる被験抗体としては、例えば、IgG、scFvをCH1-ヒンジ-CH2-CH3のN末端に付加した抗体分子、scIgG (scFabをヒンジ-CH2-CH3のN末端に付加した抗体分子)、scDb等を  
25 好適に挙げることができる。本発明においては、通常、異なる抗原に対するそれぞれの抗体ライブラリーを細胞へ重複感染させるが、scDbを用いる場合には、

抗体ライブラリーは単一のライブラリーとすることが可能である。

本発明の好ましい態様においては、抗体ライブラリーを細胞へ導入する。抗体が多種特異性抗体の場合、第一の受容体鎖および第二の受容体鎖に対するそれぞれの抗体ライブラリーを細胞へ導入する。該抗体ライブラリーとしては、例えば、

5 レトロウイルス抗体ライブラリーを好適に使用することができる。レトロウイルスは、感染効率を 10%程度に調節することによって、ほとんどの感染細胞において 1 コピーのウイルスの組み込みが期待できること、および、導入遺伝子が宿主の染色体に組み込まれるため、長期間安定に遺伝子の発現が期待できる等の特長を有する。その他抗体ライブラリーが作製可能なウイルスベクターとしては、ア

10 デノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、HIV 等の DNA および RNA ウイルス等が挙げられる。

また、抗体ライブラリーは、公知の方法に従って構築することができる(例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990); Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 582-597 (1991)等参照)。より具体的には、下記のようにして抗体ライブラリーを作製することができるが、この方法に限定されるものではない。まず、マウスに受容体の A 鎖、B 鎖それぞれを免疫する。この動物の脾細胞から mRNA を抽出し、マウスの CDR に対応するプライマーを用いて RT-PCR にて L 鎖、H 鎖の変換領域を回収する。a

15 ssembly PCR にて一本鎖 Fv(scFv)を合成し、抗体ライブラリーを構築する。パニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮し、その一本鎖可変領域を動物細胞用のシグナル配列と CH1-hinge-CH2-CH3 の間に挿入し、レトロウイルス用のプラスミドに組み込んだライブラリーを作製する。もしくは scFab として合成し、シグナル配列と-hinge-CH2-CH3 の間に挿入したライブラリーを構築する。または s

20 cDb のライブラリーとして構築する。

本発明の抗体ライブラリーは、プラスミド発現ベクターを用いて作製すること

- も可能である。本発明の上記細胞が動物細胞である場合には、例えば、pME18S (M ed. immunol. 20: 27-32 (1990))、pEF-BOS (Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990))、pCDM8 (Nature 329: 840-842 (1987))、pRSVneo、pSV2-neo、pcDNA1/Amp (Invitrogen)、pcDNA1、pAmoERC3Sc、pCDM8 (Nature 329: 840 (1987))、pAGE107 (Cytotechnology 3: 133 (1990))、pREP4 (Invitrogen)、pAGE103 (J. Biochem. 101: 1307 (1987))、pAmoA、pAS3-3、pCAGGS (Gene 108: 193-200 (1991))、pBK-CMV、pcDNA3.1 (Invitrogen)、pZeoSV (Stratagene)等を発現ベクターとして例示することができる。発現プロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルスの IE 遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー、SV40 の初期プロモーター、RSV、HI V および MMLV 等のレトロウイルスの LTR、メタロチオネイン  $\beta$ -アクチン、伸長因子 1、HSP 等の動物細胞由来の遺伝子のプロモーター等を挙げることができる。

- プラスミド発現ベクターの細胞への導入方法としては、細胞およびベクターの種類に依存するが、細胞に発現ベクターDNAを導入できる方法であれば、いずれも用いることができる。例えば、エレクトポレーション (Cytotechnology 3:133 (1990))、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075 号公報)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987); Virology 52: 456 (1973))、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いた DNA の直接注入法等が挙げられる。

- また、受容体がヘテロ受容体の場合 (抗体が多種特異性抗体の場合)、本発明の被験抗体の発現は、通常、二種の軽鎖、二種の重鎖それぞれの発現ライブラリー (ベクター) を一つの細胞に導入することによって可能となる。このとき、軽鎖と重鎖の組み合わせには通常相性はなく、4本の鎖の組み合わせは10通り存在する。最終的に本発明の方法によってスクリーニングされるアゴニスト抗体は、血中安定性を有する全長抗体 (whole antibody) であることが好ましい。このため、本発明のスクリーニング方法に供する被験抗体も、全長抗体であることが好ましい。上記のようにそのままライブラリー等で細胞内で発現させた場合、10

通りもの抗体が分泌され、他の組み合わせの抗体による中和作用の心配があるため、所望の重鎖と軽鎖の組み合わせとなる被験抗体を発現させることが好ましい。所望の重鎖と軽鎖の組み合わせとするためには、例えば、望ましい共通の軽鎖を使用することが挙げられる。または、ホモの重鎖の組み合わせとならないように、

- 5 重鎖の CH3 領域へのアミノ酸置換によって「knobs-into-holes」(Protein Engineering vol.9, 617-621, 1996; W098/50431)を導入し、重鎖のホモ二量体の形成を阻害させ、ヘテロな組み合わせとなるようにすることも可能である。従って本発明における被験抗体の CH3 は、好ましくは、アミノ酸置換によって knobs-into-holes が導入されていることを特徴とする。また、CL、CH1 に適当なアミノ酸
- 10 置換を行い、軽鎖と重鎖の組み合わせを規定することによって、ヘテロ抗体の産生効率を高めることもできる。さらに、軽鎖と重鎖の変換領域をリンカーで結んだ一本鎖可変領域 scFv を使用することにより、軽鎖と重鎖の組み合わせを規定し、scFv-CH1-ヒンジ-CH2-CH3 の形で被験抗体を発現させることも可能である。従って本発明の態様の一つとして被験抗体は、軽鎖と重鎖の変換領域がリンカー
- 15 で結ばれていることを特徴とする。この変換領域がリンカーで結ばれている被験多種特異性抗体は、例えば、以下のようにして作製することができるが、これらの方法に特に限定されない。

- (1) 第一の受容体鎖に対する一本鎖 Fv を作製し、次いで、該一本鎖 Fv を CH1-hinge-CH2-CH3 に結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体
- 20 を作製し、該一本鎖抗体を含むように被験抗体を作製する。

- (2) 第一の受容体鎖に対する一本鎖 Fab を作製し、次いで、該一本鎖 Fab を Fc に結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体を作製し、該一本鎖抗体を含むように被験抗体を作製する。

- また、公知の製造方法を用いて作製された多種特異性抗体を被験抗体として、
- 25 本発明のアゴニスト多種特異性抗体のスクリーニング方法へ供することもできる。

本方法の上記工程 (a) における被験抗体と受容体との「接触」とは、例えば、

細胞に発現している受容体に対して、上記の如く細胞中において発現し、細胞外へ分泌された被験抗体が「接触」することを指すが、この接触の形態に特に制限されない。

- 本発明の上記スクリーニング方法においては、次いで、被験抗体がアゴニスト作用を有するか否かの判定を行い（工程（b））、アゴニスト作用を有する抗体を選択する（工程（c））。

- 本発明の好ましい態様における上記工程は、被験抗体についてアゴニスト作用を有するか否かの判定を、上記の如く細胞がオートクライン自律増殖をするか否かを指標として行い、オートクライン自律増殖する場合に、該細胞において発現された抗体をアゴニスト抗体として選択する。

- 本発明のスクリーニング方法によって選択されたアゴニスト抗体は、通常、オートクライン自律増殖した細胞を回収し、適宜クローニングを行い、該細胞を用いてPCR法により、上記アゴニスト多種特異性抗体のCDR遺伝子を回収し、抗体産生に供することができる。CDR遺伝子を基に抗体を産生することは、当業者においては一般的な方法により、通常行い得ることである。

受容体がヘテロ受容体の場合、本発明のアゴニスト多種特異性抗体のスクリーニング方法は、具体的には、以下のようにして実施することができるが、この方法は本発明の一つの態様であり、本発明の方法がこの方法に特に限定されるものではない。

- 抗体がリガンドとして作用する受容体の鎖（例えば、A鎖およびB鎖）の細胞外領域を免疫化した動物からそれぞれの抗体ファージライブラリーを製し、抗受容体鎖抗体をパンニング法により選択する。これをレトロウイルススペクターのライブラリーに変換する。

- 次に、リガンド依存的に増殖できる細胞株を用意する。この細胞に抗A鎖抗体ライブラリーを感染導入し、感染細胞をベクターに付加した薬剤耐性で選択し培養する。続いて抗B鎖抗体ライブラリーを重感染する。これで抗A鎖抗体と抗B

鎖抗体のあらゆる組み合わせの二種特異性抗体を発現する細胞のライブラリーを構築することができる。このうち適当な組み合わせの二種特異性抗体が標的受容体に対してアゴニスト作用を示す場合、これを分泌するクローンのみがそのオートクラインによって自律増殖することができる。このように選択された BaF3 ク

- 5      ローンの染色体から組み込まれた抗体遺伝子を PCR によって回収する。

このようにオートクライン自律増殖を指標としてアゴニスト作用を有する抗体をスクリーニングする手法は、これまでのところ知られておらず、本発明者らによって初めて見出されたものである。本発明は、多種特異性抗体を含む一般的な抗体についてのオートクライン増殖を利用したアゴニスト抗体のスクリーニング

- 10    方法も提供する。

上記スクリーニング方法においては、まず、被験抗体、および多量体化する受容体を発現する細胞であって、該受容体の因子に依存して増殖する細胞を提供する（工程（A））。次いで、細胞がオートクライン自律増殖する場合に、被験抗体はアゴニスト作用を有するものと判定を行い（工程（B））、アゴニスト作用

- 15    を有する抗体を選択する（工程（C））。

上記方法はアゴニスト多種特異性抗体のスクリーニングに特に限定されず、多種特異性を示さないアゴニスト抗体のスクリーニングも上記方法に含まれる。

一般的に軽鎖は、抗体の特異性にあまり影響を及ぼさないことが知られていることから、多種特異性抗体の場合でも、細胞に2種類の重鎖および2種類の軽鎖

- 20    を導入することなく、1種類の軽鎖を予め細胞に発現させた後、2種類の重鎖のライブラリーを導入することによっても、上記方法を実施することが可能である。従って、上記方法における好ましい態様においては、上記工程（A）～（C）に加えて、工程（A）の細胞が、受容体をコードする遺伝子および被験抗体の軽鎖をコードする遺伝子が導入された細胞であり、さらに、被験抗体の重鎖をコードする遺伝子を導入する工程を含む。

また、本発明は、本発明のアゴニスト抗体のスクリーニング方法を利用した、

アゴニスト抗体を製造する方法を提供する。

上記方法においては、まず、本発明のアゴニスト抗体のスクリーニング方法により、アゴニスト抗体をスクリーニングし、スクリーニングにより選択されるアゴニスト抗体をコードする遺伝子を宿主細胞へ導入する。次いで、該宿主細胞、

- 5 または該細胞の培養液から、アゴニスト多種特異性抗体を回収する。

このようにして得られた本発明の抗体は、細胞内、または、シグナル配列を用いて細胞外に分泌させた場合には培地等から単離し、実質的に純粋なポリペプチドとして精製することもできる。ポリペプチドの分離、精製は、一般的に使用される、クロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈澱、溶媒抽出、  
10 蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、再結晶等の方法を適宜選択し、必要に応じて組合せることにより行うことができる。クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein

- 15 Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Course Manual, Harlow and David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988))。これらのクロマトグラフィーは、HPLC や FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。また、本発明の抗体は  
20 抗原に対して結合することから、抗原への結合性を利用して精製することも可能である。このように単離・精製されたアゴニスト抗体自体も本発明に含まれる。

本発明の好ましい態様における被験抗体は、上述のように、軽鎖と重鎖の可変領域をリンカーで結ばれ、かつ CH3 にアミノ酸置換によって knobs-into-holes が導入されている。従って、本発明によって提供される抗体は、好ましくは、抗  
25 体の軽鎖と重鎖の可変領域がリンカーで結ばれ、かつ抗体の CH3 に、アミノ酸置換によって Knobs-into-holes が導入されていることを特徴とするアゴニスト抗

体である。

- 本発明のスクリーニング方法においてアゴニスト活性の検出指標として用いられるのは、増殖活性であることが好ましいが、その他に例えば、産生物質（分泌タンパク質、表面抗原、細胞内タンパク質、mRNA等）の量的及び／又は質的変化、足場依存性、サイトカイン依存応答性、ホルモン依存性、薬剤耐性、細胞運動性、細胞遊走活性、拍動性、細胞内物質の変化、タンパク質のリン酸化、酵素反応などを用いることが可能である。

- 本発明のスクリーニング方法によって取得できるアゴニスト抗体は、従来知られている多種特異性抗体と同様に、免疫治療または予防のための医薬品とすることができる。ヘテロニ量体を構成する免疫系の受容体のリガンドとして IL-10、12、24、4、7、9、13、TSLP、IFN $\alpha$ 、 $\beta$ 等が、神経系の受容体のリガンドとして、NGF、GDNF、NT-3、4、5 が知られている。本発明の方法により取得されるアゴニスト抗体として、例えば、上記のリガンド様作用を有する抗体を取得することが可能である。本発明の方法によって取得される抗体は、免疫または神経系疾患等の治療のための医薬品となるものと期待される。

- 治療または予防目的で使用される本発明の抗体を有効成分として含む医薬組成物は、必要に応じ、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有機酸等）、防腐剤、界面活性剤（PEG、Tween等）、キレート剤（EDTA等）、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げ



られ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG 等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート 80、HCO-50)等と併用してもよい。

- また、必要に応じ本発明の抗体をマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16<sup>th</sup> edition", Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の抗体に適用し得る(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981); Langer, chem. Tech. 12: 98-105 (1982); 米国特許第 3, 773, 919 号; 欧州特許出願公開(E P) 第 58, 481 号; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP 第 133, 988 号)。

- 患者への投与は、好ましくは注射や点滴により行われ、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内、経気管支、筋内、経皮または経口等の経路により当業者に公知の方法により行い得る。投与量は、患者の体重、年齢、疾病の種類、症状、投与方法等の種々の要因により変化するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することができる。

- また、本発明の抗体をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、naked プラスミドによる直接投与の他、リボソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、HIV ベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか(Adolph『ウイルスゲノム法』, CRC Press, Florida (1996)参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆(WO93/17706 等)して投与することができる。しかしながら、生体内において抗体が発現され、その作用を発揮で

- きる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路（静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法（電子銃等による）、添鼻薬等粘膜経路を介する方法等）により十分な量が投与される。ex vivo において
- 5 リボソームトランスフェクション、粒子衝撃法（米国特許第 4,945,050 号）、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髄由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明の抗体をコードする遺伝子を投与してもよい。

#### 図面の簡単な説明

- 10 図 1 は、自律増殖株 CM による増殖を示す図である。浄した MPL 発現 BaF3 細胞（MPL の細胞外領域と GCSF 受容体の膜貫通・細胞内領域とのキメラ受容体発現細胞：TPG）10000 /well に、ウイルスの感染により自律増殖能を得た MPL 発現 BaF3 細胞の様々な濃度の培養上清 200  $\mu$ L を加え、3 日後に生細胞数測定試薬 SF（Nakarai）20  $\mu$ L を加えて 2.5 時間後 450 nm の吸光度を測定して生細胞数を調べた。
- 15 MPL 発現 BaF3 細胞（HL(TPG)および LH(TPG)）は、培養上清の濃度依存的に細胞増殖を維持していた。一方、受容体を発現していない親株の BaF3（HL(BaF3)および LH(BaF3)）は抗体が作用しない為、増殖しなかった。横軸は CM 濃度（%）、縦軸は 450～655nm における吸光度を示す。
- 20 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### [実施例 1] diabody によるオートクライン増殖

- 25 アゴニスト抗体のモデルとして mpl に対するモノクローナル抗体 12E10(W099/10494)を利用した。抗体 12E10 可変領域をコードする pC0Ssc12E10 (W001/79494、

- WO02/33072)から diabody をコードする EcoRI-NotI 断片を切り出し、ウイルスベクタープラスミド pMX の EcoRI と NotI の間に挿入した。このプラスミド pMXsc12E10 をパッケージング細胞 Pt-E に FuGene6 (Roche) を用いてトランスフェクションした。Pt-E を 10% 牛胎児血清 (FCS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で 6cm dish に播種し、翌日 FuGene6 とプラスミド pMXsc12E10 を混合したものを培地に加えた。その翌日、培養液を交換し 24 時間後培養上清を回収した。組換えウイルスを含む培養上清に 10  $\mu$ g/mL ポリブレン (Hexadimethrine Bromide, Sigma) を加え、これに標的細胞を懸濁して感染させた。因子依存性細胞株 BaF3 に ヒト MPLcDNA を導入し、MPL リガンドつまり Thrombopoietin の添加により増殖可能になった細胞株 MPL/BaF3 (MPL の細胞外領域と G-CSF 受容体の膜貫通・細胞内領域とのキメラ受容体を発現する細胞) にマウスインターロイキン-3 (IL-3) を含むウイルス液加えて感染させた。翌日細胞を PBS で洗浄後、因子を含まない R PMI/10%FCS 中で培養を続けたところ、自律増殖する細胞が得られた。この細胞の培養上清を回収し、別の MPL/BaF3 に加え培養したところ、加える培養上清濃度依存的な細胞増殖が確認された。このことからウイルス感染細胞の自律増殖が、本細胞が培地中に分泌する diabody のオートクラインによる増殖であることが明らかとなった。

[実施例 2] scFv-CH1-Fc によるオートクライン増殖

- 20 pC0Ssc12B5 を鋳型に、プライマー-EcoRI-HL (5' - GGAATTCGCCGCCACCATGGAGTTTG GGCTGAGCTGGTTTTCCT -3' / 配列番号: 1) と HL-SfiI (5' - GCATGCATGGCCCCGAGG CCACTCACCTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAA -3' / 配列番号: 2) を用いて PCR を行い、5' に EcoRI、3' にスプライドナー配列及び SfiI サイトを有する scFv (H-L) 遺伝子を得た。また軽鎖-重鎖 (L-H) の順に繋いだものを得るためにまず、  
25 5Hs (5' - GCGCGCGCGGCTCCGGTGGTGGATCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG -3' / 配列番号: 3) と 3Ha-SfiI (5' - GCATGCATGGCCCCGAGGCCACTCACCTGAAGAGACGGTGACCAATT

- GTCCCTT -3' / 配列番号: 4)、もしくは 5Ls (5' - AGTCAGTCGGCCAGCCGCCATGGCG  
GACTACAAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCT -3' / 配列番号: 5) と 3La (5' - GGAGCCGCC  
GCCGCCAGAACCAACCACCAACCAACCAACCTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAAA -3'  
/ 配列番号: 6) の組み合わせのプライマーで pCOSsec12B5 を鋳型に PCR を行い、  
5 得られた両増幅産物とプライマー 5Hs と 3La で再び PCR を行うことで増幅産物を  
アセンブリした。この産物 LH は両端に SfiI サイトを有し、3' 側にはスプライ  
スドナー配列を含む。

- ヒト IgG1 の定常領域遺伝子を含むプラスミド HEF-1. 24H-gγ1 (W099/18212) を  
鋳型に PCR を行い、CH1 直前のイントロン及び CH1, hinge (プライマー EoSfiI  
10 (5' - TCGAATTCGGCTCGGGGCCAGCTTTCTGGGCGAGCCAGGCTGACCTTGGCTTT -3' / 配列  
番号: 7), HigeCH1a (5' - CACGGTGGGCATGTGTGAGTTTGTGCACAAGATTGGGCTCAACTTTT  
TTGTCCACCTTG -3' / 配列番号: 8)), CH2 (プライマー HigeCh2s (5' - CAAAACCTCA  
CACATGCCCCCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTT -3' / 配列番号: 9),  
Ch3Ch2a (5' - ACACTGTGGTTCTCGGGGCTGCCCTTTGGCTTTGGAGATGGTTTCTCGATG -3' /  
15 配列番号: 10)), CH3 (プライマー Ch2Ch3sW (5' - GGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACA  
CCC -3' / 配列番号: 11), StopNotI (5' - TAGCGGCGCTCATTTACCCGAGACAGGGAGA  
GGCTCTT -3' / 配列番号: 12)) を増幅した。これらアセンブリ PCR によって  
つなぎ、5' に EcoRI, SfiI, イントロン、3' に NotI サイトを有する IgG1 定常  
領域遺伝子を合成した。
- 20 マウスインターロイキン (IL)-3cDNA を鋳型にプライマー IL3sEcoA (5' - CGGAAT  
TCGGCCGGCTGGGCCAGCATCAGGAGCAGGAGCAGC -3' / 配列番号: 13), BamIL3ss (5' -  
GCGGATCGCGCCCACTATGGTTCTTGCCAGCTCTAC -3' / 配列番号: 14) を用いて PCR を  
行い、5' に BamHI, 3' に SfiI, EcoRI サイトを有する IL3 シグナル配列 (ss) 遺  
伝子を得た。
- 25 レトロウイルス用ベクター pMX の EcoRI-NotI サイトに合成した IgG1 定常領域  
遺伝子を導入し、pMX-CHwild を構築した。プラスミド pMX-CHwild の EcoRI-SfiI

- サイトに scFv (H-L) 遺伝子を組み込み、pMX-HL-CHwild を得た。このプラスミドから得られるウイルスが感染すると抗体 12B5 の scFv (HL 順) の C 末に CH1-hinge-CH2-CH3 が付加した抗体用分子を分泌することが期待される。また、pMX-CHwild の BamHI-EcoRI サイトに IL3ss を組み込み、さらに SfiI サイトに scFv (L-H) を組み込み、pMX-IL3ss-LH-CHwild を構築した。このプラスミド由来ウイルスでは LH 順の scFv- CH1-hinge-CH2-CH3 が分泌されることが期待される。以上のプラスミドそれぞれを前記のように Pt-E 細胞にトランスフェクションして組換えウイルスを得、MPL/BaF3 細胞に感染させ、翌日洗浄によって因子を除去して培養を続けた。その結果、自律増殖してくる細胞が得られた。この細胞の培養上清を回収し、別の MPL/BaF3 に加え培養したところ、加える培養上清濃度依存的な細胞増殖が確認された (図 1、TPG)。一方、受容体を発現していない親株の BaF3 には抗体が作用しない為、増殖しなかった (図 1、BaF3)。このことからウイルス感染細胞の自律増殖が、本細胞が培地中に分泌する scFv- CH1-hinge-CH2-CH3 のオートクラインによる増殖であることが明らかとなった。

15

#### 産業上の利用の可能性

- 本発明により、アゴニスト抗体を効率的にスクリーニングできる新規な方法が提供された。本発明の好ましい態様においては、抗体をライブラリーとして用いることにより、煩雑な作業を必要とせず、簡便にスクリーニングすることが可能である。また、本発明の好ましい態様においては、オートクライン自律増殖をスクリーニングの指標として、自らアゴニスト抗体を分泌するクローンのみが受容体を介したシグナルで増殖した細胞を選択するため、多検体 (抗体ライブラリー) を一度に処理することができ、非常に効率的である。

## 請求の範囲

1. 以下の工程 (a) ~ (c) を含む、アゴニスト抗体のスクリーニング方法。
  - (a) 被験抗体、および多量体を形成する受容体を発現する細胞であって、該受
- 5 容体の因子に依存して増殖する細胞を提供する工程
  - (b) 細胞がオートクライン自律増殖する場合に、被験抗体はアゴニスト作用を有するものと判定する工程
  - (c) アゴニスト作用を有する抗体を選択する工程
2. 工程 (a) の細胞が、受容体をコードする遺伝子および被験抗体の軽鎖を
- 10 コードする遺伝子が導入された細胞であり、さらに、被験抗体の重鎖をコードする遺伝子を導入する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。
  3. 受容体が、細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質とのキメラ受容体である請求項 1 または 2 に記載の方法。
  4. 受容体が、二量体を形成する受容体である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載
  - 15 の方法。
    5. 二量体を形成する受容体が、ホモ二量体を形成する受容体である請求項 4 に記載の方法。
    6. 二量体を形成する受容体が、ヘテロ二量体を形成する受容体である請求項 4 に記載の方法。
  - 20 7. 細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質が G-C S F 受容体である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。
    8. 抗体ライブラリーを、細胞へ導入することを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。
    9. 抗体ライブラリーがレトロウイルス抗体ライブラリーである、請求項 8 に
    - 25 記載の方法。
      10. 被験抗体が多種特異性抗体である請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法

- 1 1. 被験抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域がリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。
- 1 2. 可変領域がリンカーで結ばれている抗体が、以下の工程 (a) ~ (c) を含む方法により作製されることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。
- 5 (a) 第一の受容体鎖に対する一本鎖 Fv を作製する工程  
(b) 該一本鎖 Fv を CH1-hinge-CH2-CH3 に結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体を作製する工程  
(c) 工程 (b) で作製された一本鎖抗体を含む多種特異性抗体を作製する工程
- 1 3. 可変領域がリンカーで結ばれている抗体が、以下の工程 (a) ~ (c) を含む方法により作製されることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。
- 10 (a) 第一の受容体鎖に対する一本鎖 Fab を作製する工程、  
(b) 該一本鎖 Fab を Fc に結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体を作製する工程、  
(c) 工程 (b) で作製された一本鎖抗体を含む多種特異性抗体を作製する工程
- 15 1 4. 以下の工程 (a) ~ (c) を含む、アゴニスト多種特異性抗体のスクリーニング方法。  
(a) 第一の受容体鎖と第二の受容体鎖を有する受容体の、該第一の受容体鎖に結合し得る可変領域および該第二の受容体鎖に結合し得る可変領域を含む被験多種特異性抗体を、該受容体に接触させる工程
- 20 (b) 被験多種特異性抗体がアゴニスト作用を有するか否かを判定する工程  
(c) アゴニスト作用を有する抗体を選択する工程
- 1 5. 受容体、および被験多種特異性抗体を同一の細胞で発現させることを特徴とする請求項 1 4 に記載の方法。
- 1 6. 細胞が、受容体の因子に依存して増殖する細胞である、請求項 1 5 に記載の方法。
- 25 1 7. 受容体が細胞増殖シグナルを発する機能を有する、請求項 1 5 または 1

6に記載の方法。

18. 受容体が、細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質とのキメラ受容体である請求項17に記載の方法。

19. 細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質がG-CSF受容体である、請求項18に記載の方法。

20. 細胞がオートクライン自律増殖する場合に、被験多種特異性抗体はアゴニスト作用を有するものと判定される、請求項15～19のいずれかに記載の方法。

21. 第一の受容体鎖および第二の受容体鎖に対するそれぞれの抗体ライブラリーを、細胞へ導入する工程をさらに含む、請求項15～20のいずれかに記載の方法。

22. 抗体ライブラリーがレトロウイルス抗体ライブラリーである、請求項21に記載の方法。

23. 多種特異性抗体の軽鎖と重鎖の可変領域がリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項14～22のいずれかに記載の方法。

24. 可変領域がリンカーで結ばれている多種特異性抗体が、以下の工程

(a)～(c)を含む方法により作製されることを特徴とする、請求項23に記載の方法。

(a) 第一の受容体鎖に対する一本鎖Fvを作製する工程

20 (b) 該一本鎖FvをCH1-hinge-CH2-CH3に結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体を作製する工程

(c) 工程(b)で作製された一本鎖抗体を含む多種特異性抗体を作製する工程

25. 可変領域がリンカーで結ばれている多種特異性抗体が、以下の工程

(a)～(c)を含む方法により作製されることを特徴とする、請求項23に記載の方法。

(a) 第一の受容体鎖に対する一本鎖Fabを作製する工程、



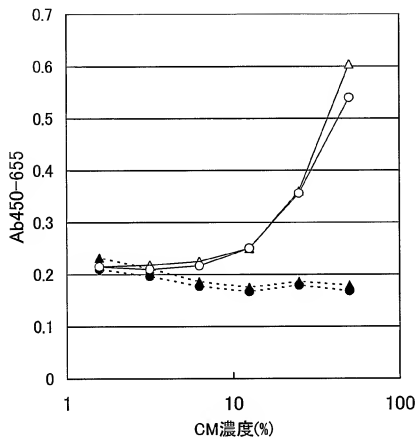
(b) 該一本鎖 Fab を Fc に結合させることにより、第一の受容体鎖に対する一本鎖抗体を作製する工程、

(c) 工程 (b) で作製された一本鎖抗体を含む多種特異性抗体を作製する工程

26. 多種特異性抗体の CH3 に、アミノ酸置換によって Knobs-into-holes が導入されていることを特徴とする、請求項 14～25 のいずれかに記載の方法。
27. 多量体がヘテロ二量体である、請求項 14～26 のいずれかに記載の方法。
28. 多種特異性抗体が、二種特異性抗体である、請求項 14～27 のいずれかに記載の方法。
- 10 29. 以下の工程 (a)～(c) を含むアゴニスト抗体を製造する方法。
- (a) 請求項 1～28 のいずれかに記載の方法により、アゴニスト抗体をスクリーニングする工程、
- (b) 工程 (a) のスクリーニングにより選択されるアゴニスト抗体をコードする遺伝子を宿主細胞へ導入する工程、
- 15 (c) 工程 (b) の宿主細胞、または該細胞の培養液から、アゴニスト抗体を回収する工程
30. 抗体、および該抗体との結合により多量体化する受容体を発現する細胞であって、該受容体の因子に依存して増殖する細胞。
31. 受容体が、細胞増殖シグナルを発する機能を有するタンパク質とのキメラ受容体である請求項 30 に記載の細胞。
- 20 32. 抗体が多種特異性抗体である請求項 30 または 31 に記載の細胞。
33. 抗体との結合により多量体化した受容体が、細胞増殖シグナルを発する機能を有する、請求項 30～32 のいずれかに記載の細胞。
34. 抗体の軽鎖と重鎖の可変領域がリンカーで結ばれ、かつ抗体の CH3 に、
- 25 アミノ酸置換によって Knobs-into-holes が導入されていることを特徴とするアゴニスト多種特異性抗体。

1 / 1

図 1



1 / 7

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

&lt;120&gt; Method for screening of agonist bispecific antibody

&lt;130&gt; C1-A0204P

&lt;150&gt; JP 2002-127260

&lt;151&gt; 2002-04-26

&lt;160&gt; 14

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 1

ggaattcgcc gccaccatgg agtttgget gagctgggtt ttctt

45

2 / 7

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 58

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 2

gc atgc atgg cccccg aggc cactcacctt tgatctcag cttgtccct cgcgcgaa 58

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 3

ggcggcgcg gctccggtgg tggatgcc caggtgcagc tggtcagtc tgg 53

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 54

3 / 7

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 4

gcatgcatgg cccccgaggc cactcacctg aagagacggt gaccattgtc cctt 54

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 5

agtcagtcgg ccacgccggc catggcggac tacaaagaca tccagatgac ccagtctcct 60

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 76

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

4 / 7

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 6

ggagcgcg ccgccagaac caccaccacc agaaccacca ccaccttga tetccagatt 60

ggtcctccg ccgaaa

76

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 7

tcgaattcgg cctcgggggc cagctttctg ggcaggcca ggcctgacct tggcttt 57

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

5 / 7

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 8

cacgggtgggc atgtgtgagt ttgtgcacaa gatttgggct caactttctt gtccaccttg 60

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 9

caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagcttt 60

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

6 / 7

## Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 10

acacctgtgg ttctcggggc tgccctttgg ctttgagat ggttttctcg atg 53

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

## Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 11

ggcagcccg agaaccacag gtgtacacc 30

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

## Synthesized Primer Sequence



7 / 7

&lt;400&gt; 12

tagcgccgc tcattacc ccggagacagg agaggctett

40

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 13

cggaattcgc ccggtgggc cagcatcagg agcaggagca gc

42

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 14

gcggatccgc cgccaccatg gttcttgcca getctac

37

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05372

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, C07K16/44, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/02,  
G01N33/50, G01N33/15, A61K39/395, A61P25/00, A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, C07K16/44, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/02,  
G01N33/50, G01N33/15, A61K39/395, A61P25/00, A61P37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/  
GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 99/38008 A1 (Prolifaron, Inc.), 29 July, 1999 (29.07.99)	1-25, 27-33 26, 34
X Y	XIE M.H. et al., Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv. Nature Biotechnology 1997, Vol.15, pages 768 to 771	1-6, 8-18, 20-25, 27-33 7, 19, 26, 34
Y	WO 98/50431 A2 (Genentech, Inc.), 12 November, 1998 (12.11.98), & EP 0979281 A1 & JP 2001-523971 A	26, 34
X	SCOTT W. et al., Activation of Chimeric and Full- length Growth Hormone Receptors by Growth Hormone Receptor Monoclonal Antibodies. J.Biol.Chem. 1998, Vol.273, pages 5307 to 5314	1-7, 26-31, 33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 May, 2003 (20.05.03)

Date of mailing of the international search report  
03 June, 2003 (03.06.03),

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05372

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKAHASHI T. et al., Swapping between Fas and Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor. J.Biol.Chem. 1996, Vol.271, No.29, pages 17555 to 17560	1-7,29-31, 33
A	SHNEIDER H. et al., Homodimerization of erythropoietin receptor by a bivalent monoclonal antibody triggers cell proliferation and differentiation of erithroid precursors. Proc. Natl.Acad.Sci. USA 1977, Vol.89, No.2, pages 473 to 482	1-34
A	PRAT M. et al., Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. Journal of Cell Science 1998, Vol.111, No.2, pages 237 to 247	1-34

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/00, C07K 16/44, C12N 5/10, C12P 21/08, C12Q 1/02, G01N 33/50, G01N 33/15, A61K 39/395, A61P 25/00, A61P 37/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/00, C07K 16/44, C12N 5/10, C12P 21/08, C12Q 1/02, G01N 33/50, G01N 33/15, A61K 39/395, A61P 25/00, A61P 37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用する電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO 99/38008 A1 (Prolifaron, Inc.) 1999. 07. 29	1-25, 27-33/ 26, 34
X/Y	XIE M.H. et al, Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv. Nature Biotechnology 1997, Vol. 15, p. 768-771	1-6, 8-18, 20- 25, 27-33/ 7, 19, 26, 34
Y	WO 98/50431 A2 (Genentech, Inc.) 1998. 11. 12 & EP 0979281 A1 & JP 2001-523971 A	26, 34

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日以前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日以前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 05. 03

国際調査報告の送付日

03.06.03

国際調査機関の名称及び代表

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

(印)

4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SCOTT W. et al, Activation of Chimeric and Full-length Growth Hormone Receptors by Growth Hormone Receptor Monoclonal Antibodies. J. Biol. Chem. 1998, Vol. 273, p. 5307-5314	1-7, 29-31, 33
X	TAKAHASHI T. et al, Swapping between Fas and Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor. J. Biol. Chem. 1996, Vol. 271, No. 29, p. 17555-17560	1-7, 29-31, 33
A	SHNEIDER H. et al, Homodimerization of erythropoietin receptor by a bivalent monoclonal antibody triggers cell proliferation and differentiation of erithroid precursors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977, Vol. 89, No. 2, p. 473-482	1-34
A	PRAT M. et al, Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. Journal of Cell Science 1998, Vol. 111, No. 2, p. 237-247	1-34